

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CHRISLAYNE PAIS VOLLBRECHT

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL CONTENDO NATAMICINA E CLORETO DE
SÓDIO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM QUEIJO MINAS CURA**

CAMPO MOURÃO

2023

CHRISLAYNE PAIS VOLLBRECHT

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL CONTENDO NATAMICINA E CLORETO DE
SÓDIO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM QUEIJO MINAS MEIA CURA**

**Edible coating containing natamycin and sodium chloride to control fungi in
minas half cure cheese**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em nome do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann

Coorientador: Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia

CAMPO MOURÃO

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira**



CHRISLAYNE PAIS VOLLBRECHT

REVESTIMENTO COMESTÍVEL CONTENDO NATAMICINA E CLORETO DE SÓDIO PARA CONTROLE DE FUNGOS EM QUEIJO MINAS CURA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 24 de Março de 2023

Luciana Furlaneto Maia, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Odinei Hess Goncalves, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Suelen Pereira Ruiz Herrig, Doutorado - Universidade Paranaense (Unipar)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 23/06/2023.

Dedico este trabalho a Deus, que me
capacita e me presenteia com as mais
ricas bênçãos de forma imerecida todos
os dias.

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui a minha sincera gratidão a todas as pessoas que estiveram, direta e indiretamente, envolvidas nessa conquista. Primeiramente, agradeço a Deus por tantas bênçãos em minha vida, sempre a mais do que mereço, sem a capacitação divina, nenhuma conquista seria possível.

Aos meus pais Marcos e Juscelina; aos meus irmãos, Christyellen e João Paulo por sempre me apoiarem e me incentivarem em tudo nas situações mais difíceis. Obrigada por se esforçarem comigo para que esse objetivo fosse alcançado, mesmo em meio a perdas de nossos entes queridos. À vocês, minha família, sou eternamente grata por tudo que sou, amo vocês.

Minha gratidão especial à Prof^a. Dr^a. Fernanda Vitoria Leimann, minha orientadora, uma excelente profissional, que me apoiou e me manteve calma em diversos momentos, você foi um anjo em minha vida. Obrigada, principalmente, por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses anos de trabalho. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, nada disso seria possível.

Obrigada a Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto Maia, pela amizade e por sempre ser tão solícita, à prontidão e aos ensinamentos que me proporcionou neste período em que trabalhamos juntas foram primordiais para a concretização de mais esta etapa.

Agradeço também aos professores Prof^a. Dr^a. Suelen Pereira Ruiz Herrig, Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini e Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves membros da banca de Qualificação e Defesa de Mestrado, pelos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para o desenvolvimento deste projeto.

Agradecimento à Gabriella, Amarilis, Anielle e Thaysa pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pois com a ajuda de vocês foi possível a concretização das análises. Nayara Cabral, pela amizade e apoio, que por diversas vezes me ajudou com o envio das amostras entre as cidades e pelas palavras de afirmação em momentos com quem compartilhei tantas preocupações.

Agradeço a toda equipe do Laticínios Latco pela disponibilidade de amostras, flexibilidade e apoio em relação à realização deste projeto. Sou muito grata também aos amigos da igreja e da minha célula, por todas as orações e palavras de incentivo que me motivaram a continuar na caminhada, vocês são essenciais em minha vida.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há
tempo para todo o propósito debaixo do
céu.” Eclesiastes 3:1
(BÍBLIA, p. 514.)

RESUMO

O queijo é considerado um dos alimentos mais consumidos no Brasil, havendo diferentes tipos, o queijo meia cura tradicional é maturado por aproximadamente 1 mês com umidade de 75% a 95%, e temperatura 7° a 14°C para desenvolvimento de suas propriedades organolépticas. A maturação e o armazenamento podem se tornar propícios para a proliferação de microrganismos deteriorantes, como os bolores e as leveduras, que prejudicam o produto de maneira considerável e trazem prejuízos econômicos à indústria alimentícia. Revestimentos comestíveis com o acréscimo do agente antimicrobiano natamicina podem aumentar a eficiência de preservação contra esses microrganismos tanto na maturação como no armazenamento. A natamicina, classificada como macrolídeo de polieno, quando aplicada, liga-se irreversivelmente ao ergosterol agindo no controle de crescimento fúngico. O objetivo deste trabalho foi desenvolver revestimento comestível contendo natamicina e cloreto de sódio para controle de fungos em queijo minas cura. Inicialmente isolou-se o fungo desenvolvido em queijos nas câmaras de maturação, sendo verificada atividade antimicrobiana da natamicina pela concentração inibitória mínima no isolado. O isolado fúngico do queijo foi identificado como pertencente ao gênero *Penicillium* pelas suas características macro e micromorfológicas, sendo que a natamicina apresentou entre as concentrações testadas (256, 128, 64 e 32 µg/mL) em meio BDA, CIM de 128 µg/mL. Foram preparadas soluções filmogênicas de caseinato de sódio, com plastificante glicerol e cloreto de sódio (NaCl) com natamicina adicionada à 500 µg/mL. Os filmes foram preparados por film casting para serem caracterizados, realizando formulações teste tanto com o acréscimo de Natamicina, Cloreto de sódio e Caseinato de sódio. Foram avaliadas a força de punção, que indicou efeito significativo da presença do NaCl reduzindo a resistência mecânica. Este também demonstrou efeito de elevar a permeação ao vapor d'água e solubilidade dos filmes. Já a natamicina não apresentou efeito nestes parâmetros. Foi realizada a Espectrofotometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para verificar as interações entre natamicina e os demais componentes do filme, sendo destacada a interação entre os grupamentos hidroxila e éter por complexos de coordenação com os íons de sódio. Com a análise de Difração de Raio-X determinou-se que a natamicina encontra-se em estado amorfo nos filmes, e a única cristalinidade identificada foi do NaCl. A verificação de coloração e textura durante a vida de prateleira das amostras com e sem a solução filmogênica, evidenciou que ao longo do tempo de armazenamento, a tendência é de igualdade ao tratamento controle. Já para a contagem microbiológica de bolores e leveduras, durante todos os meses apresentou valores menores para o queijo envolvido pela cobertura contendo o antifúngico. Porém, ambas as amostras apresentaram contagem crescente para resultados de leveduras. Pode-se concluir que a aplicação de revestimento comestível contendo natamicina para controle da proliferação de fungos durante a maturação do queijo minas meia cura obtiveram resultados satisfatórios em seus parâmetros avaliados.

Palavras-chave: caseinato de sódio; queijo minas meia-cura; maturação; bolores.

ABSTRACT

Cheese is considered one of the most consumed foods in Brazil, with different types. Maturation and storage can become conducive to the proliferation of deteriorating microorganisms, such as molds and yeasts, which considerably harm the product and bring economic losses to the food industry. Edible coatings with the addition of the antimicrobial agent natamycin can increase preservation efficiency against these microorganisms both during maturation and storage. Natamycin, classified as a polyene macrolide, when applied, irreversibly binds to ergosterol, acting to control fungal growth. The objective of this work was to develop an edible coating containing natamycin and sodium chloride to control fungi in Minas Cura cheese. Initially, the fungus developed in cheeses in the maturation chambers was isolated, and the antimicrobial activity of natamycin was verified by the minimum inhibitory concentration in the isolate. The fungal cheese isolate was identified as belonging to the genus *Penicillium* due to its macro and micromorphological characteristics, and natamycin showed between the tested concentrations (256, 128, 64 and 32 µg/mL) in PDA medium, MIC of 128 µg/mL. Filmogenic solutions of sodium caseinate were prepared, with plasticizer glycerol and sodium chloride (NaCl) with natamycin added at 500 µg/mL. The films were prepared by film casting to be characterized, performing test formulations both with the addition of Natamycin, Sodium Chloride and Sodium Caseinate. The puncture force was evaluated, which indicated a significant effect of the presence of NaCl reducing the mechanical resistance. This also demonstrated the effect of increasing the water vapor permeation and solubility of the films. Natamycin had no effect on these parameters. Fourier Transform Infrared Spectrophotometry (FTIR) was performed to verify the interactions between natamycin and the other components of the film, highlighting the interaction between the hydroxyl and ether groups by coordination complexes with sodium ions. With X-Ray Diffraction analysis it was determined that natamycin is in an amorphous state in the films, and the only crystallinity identified was that of NaCl. The verification of color and texture during the shelf life of the samples with and without the filmogenic solution, showed that over the storage time, the trend is equal to the control treatment. As for the microbiological count of molds and yeasts, during all months it presented lower values for the cheese involved by the coating containing the antifungal. However, both samples showed increasing counts for yeast results. It can be concluded that the application of an edible coating containing natamycin to control the proliferation of fungi during the maturation of Minas Meia Cure cheese obtained satisfactory results in their evaluated parameters.

Keywords: sodium caseinate; half-cure mines cheese; treated; molds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da Natamicina	26
Figura 2 - Fotografia das soluções filmogênicas depositadas em formas de Teflon.....	34
Figura 3 - Fluxograma do processo de elaboração da solução filmogênica	35
Figura 4 - Aplicação da solução filmogênica nos queijos	39
Figura 5 - Amostras de queijo minas meia cura na câmara de maturação amostra controle (AC) e amostra contendo solução filmogênica (AF)	39
Figura 6 - Pontos perfurados no centro do queijo na análise de força de punção	41
Figura 7 - (A) Características do crescimento fúngico em Compact Dry; Características macroscópicas do fungo F1: (B) 5 dias de incubação; (C) 10 dias de incubação; (D, E) destaque para as hifas hialinas septadas e conídios - Aumento 400 x; (F) característica colônias da levedura L1; (G) característica microscópica do isolado L1 – Aumento 400 x.....	42
Figura 8 - Efeito da natamicina sobre o crescimento dos fungos (A) levedura e (B) filamentoso, em meios contendo natamicina	44
Figura 9 - Diâmetro da colônia (cm) de levedura e fungo filamentoso, durante os dias de tratamento com natamicina (ug/mL)	44
Figura 10 - Efeito da natamicina na germinação de esporos e leveduras, após 24 de incubação. (A) controle do fungo filamentoso sem natamicina; (B) fungo filamentoso com 128 µg/mL de natamicina; (C) fungo filamentoso com 64 µg/mL; (D) controle da levedura; (E) levedura com 128 µg/mL de natamicina; (F) levedura com 64 µg/mL de natamicina; Seta amarela mostra a formação de tubo verminativo para fungo filamentoso e brotamento para levedura.....	46
Figura 11 - Percentual de germinação do fungo filamentoso e levedura nos tempos 0, 8 e 24 horas	46
Figura 12 - Espectros de FTIR-ATR das amostras de filmes formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa).....	51

Figura 13 - Difratoogramas de raio-X das amostras formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa).....	52
Figura 14 - Resultados de contagem de bolores e leveduras (Log 10) realizadas no queijo minas meia cura durante o seu processo de maturação na amostra controle (AC) e na amostra com a solução filmogênica (AF).....	53
Figura 15 - Queijo minas meia cura com e sem cobertura após o período de maturação	54
Figura 16 - Resultados de percentual de perda de massa realizadas do queijo minas meia cura durante o seu processo de maturação da amostra controle (AC) e a amostra com a solução filmogênica (AF).....	55
Figura 17 - Parâmetro de cor e textura avaliados ao longo dos 240 dias de armazenamento do queijo minas meia cura: (A) L* e a*; (b) b* e C*; (C) h° e Delta E (diferença entre os tratamentos para cada intervalo de tempo) e (D) Força de punção determinadas no centro do queijo e na casca. AF – amostras tratadas com o filme contendo natamicina junto à salmoura, e AC- controle (somente salmoura)	60
Figura 18 - Contagem de bolores e leveduras durante o tempo de vida de prateleira para as amostras maturadas com a cobertura (AF) e sem a cobertura (AC).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média do leite de vaca	15
Tabela 2 - Desempenho de substâncias antifúngicas utilizadas para controle de fungos em alimentos da literatura.....	24
Tabela 3 - Aplicação de natamicina em filmes e revestimentos comestíveis....	28
Tabela 4 - Resultados de Força de Punção (FP), área sob a curva de punção (ASCP), permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e solubilidade (SOL) dos filmes de caseinato de sódio. Formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa).....	48
Tabela 5 - Valores experimentais da determinação dos parâmetros de cor das amostras formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa).....	50
Tabela 6 – Valores dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) e textura (Força de punção no centro (F_{centro}) e Força de punção na casca do queijo (F_{casca}) durante o shelf life das amostras AF (tratadas com o filme durante a maturação) e AC (controle). Cor da coluna formulação igual à cor real das amostras.....	58

LISTA DE SIGLAS

AC	Amostra controle
AF	Amostra com formulação
ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de perigos e pontos críticos de controle
ASCP	Área sob a curva de punção
ASTM	<i>American Society for Testing and Material</i>
ATR	Reflectância total atenuada
BDA	Batata dextrose ágar
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CIE	<i>International Commission on Illumination</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios-X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
FC	Formulação controle
FCNa	Formulação controle com NaCl
FN	Formulação com natamicina
FNNa	Formulação com natamicina e NaCl
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i>
FP	Força de Punção
GRAS	Geralmente considerado aceitável
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDA	Ingestão diária aceitável
INS	<i>International Numbering System</i>
JECFA	<i>Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Committee on Food Additives</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PVA	Permeação ao vapor d'água
SOL	Solubilidade
TPVA	Taxa de permeabilidade de vapor d'água

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 Produção do queijo e qualidade microbiológica.....	19
3.2 Substâncias antifúngicas aplicadas em queijos.....	21
3.3 Natamicina.....	25
3.4 Filmes comestíveis contendo antimicrobianos.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Material.....	31
4.2 Isolamento e identificação presuntiva de fungo superficial de queijo maturado.....	31
4.3 Análise da atividade antifúngica da natamicina.....	32
4.3.1 Preparo da solução de natamicina.....	32
4.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) da natamicina contra o isolado fúngico.....	32
4.3.3 efeito inibitório da natamicina na germinação de esporos e alongamento do tubo germinativo de levedura.....	33
4.4 Preparo da solução filmogênica.....	33
4.5 Caracterização físico-química dos filmes.....	35
4.5.1 Propriedades mecânicas (força de punção).....	35
4.5.2 Cor – Delta E.....	36
4.5.3 Solubilidade em água.....	36
4.5.4 Permeação ao vapor d'água.....	37
4.5.5 FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier).....	37
4.5.6 DRX (Difração por raio-x).....	38

4.5.7 Aplicação da solução filmogênica nos queijos e análises durante a maturação.....	38
4.5.8 Análises das amostras de queijo maturado – Shelf life.....	40
4.6 Análises estatísticas.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Isolado fúngico.....	42
5.2 Concentração inibitória mínima da natamicina.....	43
5.3 Inibição da germinação e brotamento.....	45
5.4 Caracterização físico-química dos filmes.....	47
5.5 Aplicação da solução filmogênica nos queijos e análises durante a maturação.....	53
5.6 Análises das amostras de queijo maturado – shelf-life.....	56
5.6.1 Cor e textura durante o shelf-life.....	56
5.6.2 Contagem microbiológica.....	62
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O queijo é considerado o produto lácteo mais vendido no Brasil, principalmente no período de 2005 a 2016, obtendo aumento de 124% no volume total vendido, atingindo 785 mil toneladas vendidas em 2016 (IBGE, 2019). Mesmo em período de pandemia devido ao COVID-19, o setor de lácteos no Brasil segue com demanda em alta (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, ABIQ, 2020). Em 2019, o país ocupou o quarto lugar em consumo de queijos, sendo de aproximadamente 1,12 milhões de toneladas. O consumo médio per capita no Brasil de queijos é cerca de 5,6 quilos por ano segundo estimativas da ABIQ. A título de comparação, na América Latina, a Argentina é o país de maior consumo de queijos, com 12 quilos anuais per capita (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, ABIQ, 2022).

Os queijos representam grande parte do mercado nacional de lácteos, sendo o principal responsável pela absorção de leite matéria-prima (ABIQ, 2022). O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos prevê uma produção total de leite no Brasil para 2022 de 23,7 milhões de toneladas, mas estima que em 2023 a produção deva chegar a 24,5 milhões de toneladas (ABIQ, 2023).

As características do leite e condições de fabricação determinam propriedades nutricionais distintas para cada tipo de queijo. A qualidade das matérias-primas também se relacionam diretamente com a qualidade do produto final, sendo necessário o uso de ingredientes dentro dos padrões de higiene, a fim de se obter uma vida útil maior do alimento (MARQUES *et al.*, 2020). Na Tabela 1 pode ser observado a composição média para o leite oriundo de vaca.

**Tabela 1 - Composição média do leite de vaca
(continua)**

Composição média	Leite de vaca
Água (g/L)	870
Proteínas (g/L)	35
Caseínas (g/L)	27
Lipídeos(g/L)	35 a 40
Ác. graxos essenciais(g/L)	1
Carboidratos (g/L)	51

**Tabela 2 - Composição média do leite de vaca
(conclusão)**

Composição média	Leite de vaca
Lactose (g/L)	49
Minerais (g/L)	7,0
Vitamina C mg/100 mL	2,1
Vitamina B1 µg/100 mL	40
Vitamina B2 µg/100 mL	150
Vitamina B12 µg/100 mL	0,5
Vitamina A UI/100 mL	160
Vitamina D UI/100 mL	0,3 a 4,0
Vitamina E µg/100 mL	60 a 150

Fonte: Adaptado de Vidal e Netto (2018).

O período de armazenamento de queijos em salas de maturação com umidade relativa acima de 80%, para evitar trincas na casca do produto, controle de exposição de calor e luz para controle de oxidação de ácidos graxos e aldeídos insaturados e posterior armazenamento em baixas temperaturas favorece o crescimento de fungos na superfície do queijo segundo Montel *et al.* (2014) e Sobral *et al.* (2017).

Bolores e leveduras na casca do queijo podem ser uma grande ameaça para todas as variedades do produto, em particular para queijos duros e semiduros maturados por um período considerável de tempo (MOATSOU *et al.*, 2015). Os bolores estão sempre presentes nas prateleiras de câmaras de maturação, apesar da aplicação de limpeza e desinfecção. Fragmentos de micélio e esporos de bolores podem circular pelos sistemas de ar-condicionado das salas de maturação (MEDEIROS; SOUZA; CARNEIRO-DA-CUNHA, 2014).

Uma alternativa é a aplicação direta de agentes antimicrobianos por diferentes técnicas, como pulverização, revestimento ou imersão para evitar o crescimento de fungos deteriorantes em queijo (TORRIJOS *et al.*, 2022). Porém, há a crescente preocupação do consumidor com questões de segurança alimentar, incluindo conteúdo de aditivos, com isso, busca-se por alternativas biológicas para inibir microrganismos indesejáveis e, assim, estender a vida útil dos alimentos (FERNANDEZ *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, há um grande interesse em filmes comestíveis com antimicrobianos, visando o aumento da segurança alimentar e a extensão da vida útil

dos alimentos. Isto resulta do seu potencial de diminuir a taxa de difusão antimicrobiana da superfície para a maior parte do produto, auxiliando assim na manutenção de altas concentrações do ingrediente ativo onde é necessário (OLLÉ RESA; GERSCHENSON; JAGUS, 2014).

A utilização de revestimentos comestíveis utilizando caseinato de sódio agregado à natamicina para inibição microbiana do queijo minas meia cura é uma alternativa para a conservação da qualidade microbiológica durante a etapa de maturação. De forma a otimizar a aplicação destes filmes, é possível aplicá-lo em tratamento pré-salmoura na qual o queijo é submerso previamente à maturação. Contudo, o efeito da presença do sal na solução filmogênica quanto as propriedades do filme e sua aplicação em queijos ainda não foi avaliada. Logo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de revestimento comestível de caseinato de sódio contendo natamicina, para o controle de proliferação de bolores e leveduras em queijo minas meia cura durante seu período de maturação e armazenagem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da aplicação de revestimento comestível de caseinato de sódio contendo natamicina, para o controle de proliferação de bolores e leveduras em queijo minas meia cura durante seu período de maturação e armazenagem.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Isolar e caracterizar os fungos a partir do queijo minas meia cura;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da natamicina nos isolados;
- Produzir revestimentos comestíveis de caseinato de sódio adicionados de natamicina e NaCl, além de formulações controle, por *film casting*;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos filmes por FTIR, permeação ao vapor d'água, solubilidade em água, cor, opacidade e força de punção;
- Determinar se a presença de NaCl interfere nas propriedades do filme contendo natamicina;
- Aplicar o revestimento contendo Natamicina e NaCl nas amostras de queijo pré-maturação;
- Avaliar a maturação das amostras de queijo tratadas com o revestimento averiguando a proliferação de microrganismos nos mesmos;
- Determinar a coloração, textura e desenvolvimento de bolores e leveduras nas amostras durante a vida útil (240 dias).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção do queijo e qualidade microbiológica

Queijo é o produto obtido pela separação parcial do soro em relação ao leite ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, destinados para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos, origina o produto lácteo denominado queijo, sendo considerado fresco ou maturado e que não contenha gordura ou proteína de origem não láctea (BRASIL, 2017).

Os queijos possuem diferentes tipos de classificação, segundo Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, atentando-se à matéria gorda no extrato seco e à umidade. Sendo classificados pela percentagem de matéria gorda no extrato seco como extra gordo ou duplo creme com mínimo de 60% de umidade, gordos estando entre 45,0 e 59,9%, semigordo tendo 25,0 a 44,9%, magros entre 10,0 a 24,9% e desnatados com valores com menos de 10%. Em relação à umidade, são considerados queijos de baixa umidade ou massa dura com umidade de até 35,9%, queijos de média umidade ou massa semidura com umidade entre 36,0 e 45,9%. Queijos de alta umidade sendo massa branda ou macios, estando 46,0 a 54,9% e queijo de muita alta umidade, massa branda ou mole com umidade acima de 55%.

Tais produtos podem ser produzidos em estabelecimentos denominados Fábrica de Laticínios, que envolvem etapas desde a recepção de leite, transferência, refrigeração, beneficiamento, manipulação, fabricação, maturação, fracionamento, ralação, acondicionamento, rotulagem, armazenagem e expedição de derivados lácteos, conforme o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (BRASIL, 2017). Ainda, segundo o MAPA, considera-se a data de fabricação dos queijos frescos o último dia da sua elaboração e, para queijos maturados, o dia do término do período da maturação (BRASIL, 2017). Cada tipo de queijo possui um determinado tempo de maturação para alcançar as propriedades sensoriais desejadas (BRASIL, 1996).

Conforme Messini *et al.* (2017), a contaminação por bactérias, bolores e leveduras podem ocorrer durante a maturação de certos tipos de queijo, pois nessa etapa ocorrem mudanças bioquímicas envolvendo enzimas endógenas do leite, microbiota inicial e microrganismos secundários como os bolores, que se concentram

na superfície, os quais geram mudanças visuais com formação de manchas pretas. Como também, durante o armazenamento, desenvolvendo sabores estranhos diminuindo a qualidade do queijo, principalmente quando armazenado sem embalagem (COSTA *et al.*, 2018).

A microbiota nas superfícies dos queijos é complexa e caracterizada por diferentes microrganismos que influenciam as propriedades sensoriais e estruturais dos queijos (IRLINGER; MOUNIER, 2009). Leveduras e bolores metabolizam o ácido láctico e produzem amônia como resultado da proteólise. Assim, o pH da superfície aumenta de 4,8-5,2 até 6-8,2, o que favorece o crescimento de bactérias tolerantes ao sal e sensíveis ao ácido (MONTEL *et al.*, 2014). Pode haver proliferação de diversos tipos de bolores e leveduras, como *Cladosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Geotrichum* (FERNANDEZ *et al.*, 2017).

Messini *et al.* (2017) afirmam que bolores do gênero *Cladosporium* não são possíveis de retirar da casca umedecendo ou escovando a seco o queijo no procedimento de toaleta, devido à formação de grandes manchas negras profundas que ocorrem pelo micélio fúngico. *Cladosporium* é um dos fungos aerotransportados mais comuns encontrados em ambientes internos e externos, com risco potencial de formação das micotoxinas, o que prejudica a saúde do consumidor, causando grande preocupação em fábricas de laticínios.

Para que a indústria láctea cumpra o estabelecido na legislação vigente, mantendo a qualidade física e microbiológica de queijos e outros derivados, faz-se necessário o uso de tecnologias com mecanismos de controle microbiológico. Dentre as várias tecnologias usadas na atualidade pela indústria, pode-se destacar o uso do ozônio (O₃) por sua versatilidade, sendo uma tecnologia com uso promissor na área de alimentos (JERMANN *et al.*, 2015). O O₃ pode ser utilizado no processamento, na qualidade microbiológica, na sanitização e no armazenamento segundo Brodowska *et al.* (2017), apresentando potencial antibacteriano, antifúngico, antiparasitário e antiviral, ampliando sua aplicabilidade (PANDISELVAM *et al.*, 2018).

A redução da carga microbiológica em queijos é um dos principais usos do ozônio em alimentos de origem animal, principalmente para bolores e leveduras (VARGA e SZIGETI, 2016). Além de eliminar fungos que afetam as características sensoriais dos queijos, o ozônio tem a capacidade de reduzir a contagem de bactérias patogênicas presentes (YONG *et al.*, 2014).

Outra alternativa para evitar a colonização por cepas pertencentes ao gênero *Cladosporium* durante a maturação, é pela superfície dos queijos a qual é normalmente recoberta com soluções poliméricas enriquecidas com antifúngicos como natamicina ou soluções antimicrobianas. No entanto, os microrganismos podem rapidamente desenvolver resistência a tais substâncias (MESSINI *et al.*, 2017).

3.2 Substâncias antifúngicas aplicadas em queijos

A deterioração dos alimentos é um grande problema tanto para a indústria alimentícia como para os consumidores, uma vez que torna o produto impróprio para o consumo humano, acarretando desperdícios e em grandes perdas econômicas. Tal deterioração ocorre pelas atividades microbianas, como bactérias e fungos (GARNIER *et al.*, 2017). No âmbito mundial, entre um quarto e um terço dos alimentos produzidos anualmente para o consumo humano se perde ou é desperdiçado. Isso equivale a cerca de 1,300 bilhões toneladas de alimentos sendo 20% da carne e produtos lácteos, alimentos suficientes para alimentar dois bilhões de pessoas, segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2014).

A perda desses alimentos ocorre pelas atividades microbianas, como bactérias e fungos. Para prevenir ou retardar a deterioração por fungos, estendendo assim a vida útil e a segurança do produto, os fabricantes de laticínios empregam abordagens preventivas que incorporam tecnologia de barreira. Os métodos de prevenção podem incluir desde a aplicação de boas práticas de fabricação e higiene, implementação de um sistema de análise de perigo e ponto crítico de controle (APPCC) até o uso de equipamentos de filtragem ou purificação de ar (GARNIER *et al.*, 2017).

De acordo com Costa *et al.* (2018), a maneira convencional de prevenção é a utilização de embalagem. No momento de selecionar o material e sua composição deve ser considerado o tipo de queijo, as taxas de maturação, teor de água, transparência, permeabilidade de gases, estabilidade e propriedades mecânicas. Porém, vale ressaltar que as embalagens de queijo normalmente são compostas por polietileno, poliamida e polipropileno, possuindo limitação pela legislação quanto à migração dos mesmos ao produto. Sua composição a torna não biodegradável tampouco comestível, consideradas poluentes para o meio ambiente com a

dificuldade de descarte podendo causar problemas ecológicos, gerando a preocupação do consumidor e das indústrias alimentícias (FAJARDO *et al.*, 2010).

Com mais de 1000 variedades de queijos produzidos em escala artesanal e industrial, pode-se associar uma microbiota para contribuir não apenas com a biopreservação mas também com o desenvolvimento das propriedades sensoriais (IRLINGER; MOUNIER, 2009). A adição de compostos antimicrobianos durante a fabricação do queijo pode ser considerada uma ação mais eficiente em indústria de laticínios evitando o desenvolvimento de bolores e a preservação das características durante todo o período (COSTA *et al.*, 2018).

Existem diferentes tipos de aditivos com a função de conservante considerados antimicrobianos que podem ser utilizados em alimentos industrializados como ácido sórbico, carbonato de cálcio, benzoato de sódio, nitritos e nitratos (ANVISA, 2001). De acordo com a Portaria nº 540 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 27 de outubro de 1997, os aditivos alimentares são considerados como qualquer componente adicionado aos alimentos, com outros propósitos, que não o de nutrir, contudo, busca a modificação das características físico-químicas, de cunho biológico ou com o intuito de alterar a sensorialidade dos alimentos, desde a fase da fabricação até a embalagem e manipulação dos mesmos. Os aditivos não devem conferir odor, sabor ou cores anormais aos alimentos, não podem ser corrosivos ou deixar de obedecer estritamente aos objetivos para os quais foram atribuídos.

A Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, determina que a rotulagem de produto de origem animal embalado deve apresentar, obrigatoriamente, a informação sobre aditivos alimentares fazendo parte da lista de ingredientes. Devendo constar a função principal ou fundamental do aditivo no produto de origem animal, seu nome completo ou seu número INS, ou ambos.

Dentre os comumente utilizados nas indústrias a maioria são de origem sintética e dependem da área de aplicação. Para indústrias envolvidas com carne crua (linguiça, presunto, bacon, salame, etc.), utilizam nitratos e nitritos para inibir o crescimento principalmente de *Clostridium botulinum* (FERYSIUK e WÓJCIAK, 2020).

Já o dióxido de enxofre e sulfitos são usados para controlar o crescimento de microrganismos em frutas secas, sucos e vinhos (FERNANDEZ *et al.*, 2017). A nisina pode ser aplicada em queijo processado para controlar o crescimento potencial de

bactérias formadoras de esporos. O ambiente anaeróbico, a alta umidade e o pH de 5,4 a 6,0 normalmente encontrados em queijos processados podem permitir a germinação de esporos e o crescimento de *Clostridium* spp. ou anaeróbio facultativo *Bacillus* spp., considerados Gram positivos, se o produto não for controlado por meio de formulação segundo Glass *et al.* (2017) e Martinez-Rios *et al.* (2021).

O aditivo natamicina é utilizado para inibição de fungos, possuindo uma ampla escala de aplicação, podendo prolongar a vida útil em iogurtes e outros produtos lácteos, frutas, vegetais, saladas, produtos de panificação, molhos, peixes e aves. Da mesma forma, também é utilizada em sucos, cervejas, vinhos, sidras e chás gelados, dependendo das resoluções de cada país (DALHOFF e LEVY, 2015).

A adição direta de tais antioxidantes, agentes antimicrobianos muitas vezes não é otimizada levando a altas dosagens nos alimentos, acarretando alterações nas propriedades sensoriais como o sabor e aparência dos alimentos (BALDINO; CARDEA; REVERCHON, 2017).

De acordo com a Portaria MAPA nº 146 de 1996, aditivos são permitidos em certas concentrações para aumentar a conservação de produtos lácteos. O ácido sórbico e seus sais a 1000 mg/kg de queijo, nitrato de sódio ou potássio (isolados ou combinados), 50 mg/kg de queijo (em nitrato de sódio), liozima em 25 mg/L de leite, natamicina a 1 mg/dm² com o máximo de 5 g/kg, não podendo ser detectável a 2 mm de profundidade na massa, com restrição à aplicação na superfície dos queijos, cortados ou fatiados. A adição de aditivos em produtos não autorizados ou em quantidades superiores ao evidenciado caracteriza como fraude por adulteração. Na Tabela 2 são apresentadas algumas substâncias antifúngicas que vêm sendo estudadas quanto a sua aplicação, microrganismos alvo e sua concentração inibitória.

Tabela 2 - Desempenho de substâncias antifúngicas utilizadas para controle de fungos em alimentos da literatura

Composto	Fungo avaliado	Concentração Inibidora	Referência
Vanilina	<i>Aspergillus flavus</i>	-	Li <i>et al.</i> (2021)
Ácido gálico	<i>Candida albicans</i>	12,5 µg/mL	Li <i>et al.</i> (2017)
	Cepas de dermatófitos	43,75 e 83,33 µg/mL	
	<i>Trichophyton rubrum</i>	43,75 µg/mL	
Eugenol	<i>Rhizoctonia solani</i>	58,9 µg/mL	Zhao <i>et al.</i> (2021)
Óleo essencial de pimenta negra (<i>Piper nigrum</i>)	<i>Aspergillus niger</i>	94,65 ± 3,63 µg/mL	Purkait <i>et al.</i> (2020)
Casca de canela (<i>Cinnamomum zeyllancium</i>)		73,14 ± 3,57 µg/mL	
Óleo essencial de botão de cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)		64,63 ± 3,82 µg/mL	
Hidrolisado de soro de cabra			
Reuterina	<i>Penicillium brevicopactum</i>	3,9 mg/mL	Luz <i>et al.</i> (2020)
Natamicina	<i>Penicillium commune</i>	0,5–2,0 µM	Vimont <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Autoria própria (2022).

A Vanilina é considerado um produto natural que vem sendo aplicado nas indústrias alimentícias, sendo o extrato da semente de baunilha. Li *et al.* (2021) selecionaram esse agente antimicrobiano a fim de estudarem seus mecanismos de inibição, o qual inibiu o crescimento de micélios de *Aspergillus flavus* ao romper a integridade das paredes celulares e membranas celulares.

Zhao *et al.* (2021) selecionaram o Eugenol, composto natural presente em cravos, para inibir o *Rhizoctonia solani*, doença fúngica a qual prejudica a qualidade e produtividade do arroz. A taxa de inibição micelial do eugenol contra *R. solani* foi determinada usando o método da taxa de crescimento micelial, resultando no valor de 58,9 µg/mL da concentração inibitória para *Rhizoctonia solani*.

3.3 Natamicina

Também conhecida como pimarcina, é um agente antimicrobiano classificado como um macrolídeo de polieno (YANGILAR; OĞUZHAN YILDIZ, 2016). Produzido por fermentação aeróbica profunda de *Streptomyces natalensis* e espécies relacionadas. É usado como agente antimicrobiano em superfícies de queijo devido à sua atividade contra leveduras e mofo (COSTA *et al.*, 2018).

Embora tenha sido comprovado que a natamicina não tem efeitos tóxicos mesmo em altos níveis de ingestão, sua aplicação como aditivo alimentar ainda é restrita em todo o mundo. O objetivo é evitar sua migração para a parte interna dos alimentos devido ao possível perigo de ocorrência de resistência a antibióticos (COSTA *et al.*, 2018).

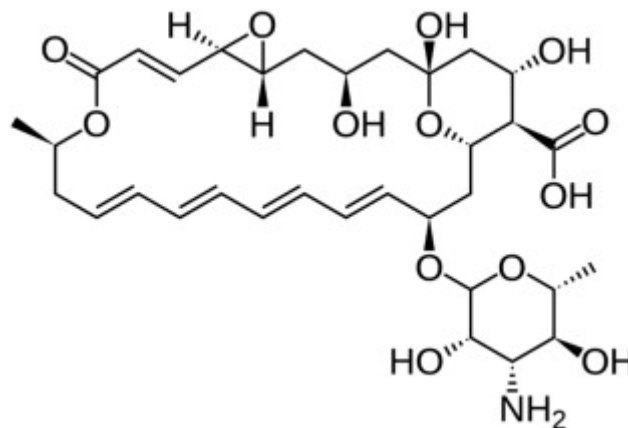
Possui atividade *in vitro* contra leveduras e fungos filamentosos como *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cephalosporium spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.* (DALHOFF e LEVY, 2015). Além disso, como as membranas bacterianas não contêm esteróis, a natamicina não é ativa contra bactérias, tornando-se então um conservante antifúngico ideal durante os processos de maturação bacteriana e fermentação dos alimentos (APARICIO *et al.*, 2016).

A utilização em superfícies de queijos é permitida em 32 países, mas poucos liberam o uso como aditivo alimentar em outros alimentos (KALLINTERI; KOSTOULA; SAVVAIDIS, 2013). Dalhoff e Levy (2015) destacam que mesmo que a superfície dos queijos a qual ocorreu aplicação do antifúngico não puder ser removida, a exposição alimentar estimada à natamicina é dez vezes menor do que o nível de ingestão diária aceitável (IDA) definido pela Organização Conjunta de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas e Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (JECFA). Logo, a natamicina é considerada um aditivo seguro para o tratamento de superfície de queijo, com status GRAS (Geralmente considerado como seguro) e número do CAS (*Chemical Abstracts Service*) de 7681-93-8 (ELSAYED *et al.*, 2019).

Devido a sua ausência de odor e coloração, a mesma não acarreta aversão ao sabor pelo consumidor tampouco influencia na aceitação do produto ao qual é aplicada. A natamicina possui comportamento hidrofóbico dificultando a remoção por lavagem, porém, mantém a sua atividade como conservante por mais tempo, conforme destacado por (DALHOFF e LEVY, 2015).

De acordo com Aparicio *et al.* (2016) sua ação é pela alteração do funcionamento do ergosterol nas membranas fúngicas, diferente dos demais polienos que comumente agem na ruptura da membrana. Te Welscher *et al.* (2008) destacam sobre o efeito inibitório no transporte de aminoácidos e glicose pela membrana plasmática, retardando o crescimento de leveduras e fungos filamentosos. Na Figura 1 é apresentada a estrutura molecular da Natamicina.

Figura 1 - Estrutura molecular da natamicina



Fonte: Balaguer *et al.* (2014).

A inativação de bolores e leveduras está diretamente relacionada à concentração da natamicina aplicada e ao método utilizado, conforme estudos já realizados (KALLINTERI; KOSTOULA; SAVVAIDIS, 2013). Os bolores são suscetíveis à concentrações mínimas inibitórias de 0,1 a 10 µg/mL de natamicina, já as leveduras são inibidas de 1 a 5 µg/mL de concentração. A ineficácia contra bactérias é útil à indústria alimentícia, pois não interfere na fermentação ou em processos de maturação (DELVES-BROUGHTON *et al.*, 2005).

Kallinteri, Kostoula e Savvaidis (2013) verificaram que os tratamentos com natamicina isolada ou combinada com nisina em duas concentrações selecionadas de 10 e 20 ppm, podem suprimir eficientemente o crescimento de leveduras e bolores amplamente encontrados no queijo Galotyri e aumentar a sua vida de prateleira consideravelmente, ultrapassando 28 dias em comparação à amostra controle (14 a 15 dias).

Conforme destacado por Ture *et al.* (2011) seu efeito benéfico pode ser prejudicado ao ser aplicada diretamente ao queijo, em contato com outro aditivo, ou pelos próprios componentes da matriz alimentícia. Sua liberação pode ser mais

gradativa e mais bem aproveitada quando agregada a biopolímeros renováveis (BALAGUER *et al.*, 2014).

3.4 Filmes comestíveis contendo antimicrobianos

Revestimentos comestíveis são produzidos em forma líquida e são aplicados diretamente na superfície do alimento e secos para formar uma camada fina, enquanto que o filme seca separadamente para formar um material independente que é então usado para cobrir o alimento (COSTA *et al.*, 2018). Ambos podem ser carreadores de agentes antimicrobianos, evitando assim o crescimento microbiano indesejado nas superfícies. Utilizados para melhorar a qualidade e a segurança dos alimentos, principalmente prolongando a vida útil, preservando o sabor, a cor e o valor nutricional do queijo (COSTA *et al.*, 2018). A aplicação de revestimentos comestíveis compostos por polímeros naturais é uma alternativa promissora para as indústrias alimentícias que visa manter a integridade do alimento por um maior período de tempo (MEDEIROS; SOUZA; CARNEIRO-DA-CUNHA, 2014).

Os agentes antimicrobianos podem ser aplicados mergulhando, pulverizando, escovando, no processo de toalete, às superfícies dos alimentos para controlar o crescimento microbiano (TURE *et al.*, 2011). Também podem ser incorporados em filmes e revestimentos comestíveis por meio de diferentes métodos, tais como a microencapsulação, multicamadas, ou em pequenas porções atuando como embalagens individuais para fatias de queijo (COSTA *et al.*, 2018).

Segundo Ramos *et al.* (2012), os agentes antimicrobianos apresentam melhor propriedade de espalhamento, difusividade e solubilidade com a matriz de queijos quando incorporados a filmes e revestimentos comestíveis. A adição no queijo reduz a deterioração protegendo a superfície da contaminação microbiana, pois o revestimento comestível mantém uma alta concentração de substâncias ativas na casca do queijo, impedindo sua rápida migração, mantendo assim as concentrações críticas por longos períodos de tempo e melhorando a eficiência de aplicação (FAJARDO *et al.*, 2010).

Podem atuar como embalagens de alimentos ou barreira a fatores externos e melhorar a vida útil e a qualidade dos produtos alimentícios (ROMERO *et al.*, 2016). Eles são geralmente biodegradáveis, não tóxicos e comestíveis e, em certas

circunstâncias, podem substituir os polímeros sintéticos. Além disso, podem servir como carreadores de agentes antimicrobianos e antioxidantes (BALAGUER *et al.*, 2014). Conforme Costa *et al.* (2018), diferentes tipos de materiais podem ser utilizados para a produção do revestimento trazendo benefícios à matriz do queijo, acoplados aos agentes microbianos, como quitosana, alginato, proteínas do soro do leite e lipídeos.

Vários tipos de antimicrobianos podem ser adicionados ao revestimento, tais como ácido láctico (RAMOS *et al.*, 2012), óleo essencial de orégano (ARTIGA-ARTIGAS; ACEVEDO-FANI; MARTÍN-BELLOSO, 2017), nisina (FAJARDO *et al.*, 2010), ácido cítrico (RAMOS *et al.*, 2012) e do interesse desse trabalho em questão, natamicina, utilizada principalmente para controle de bolores e leveduras (YANGILAR; OĞUZHAN YILDIZ, 2016). A inclusão de natamicina em uma matriz polimérica para posterior liberação sustentada na superfície do alimento pode garantir uma concentração mínima do antimicrobiano capaz de proteger o alimento contra o crescimento de fungos, e reduzir a perda de atividade do composto por interação com o alimento (BALAGUER *et al.*, 2014). Na Tabela 3 pode ser observado a adição de Natamicina em revestimentos comestíveis em queijos para determinados fungos em específico encontrados na literatura

Tabela 3 - Aplicação de natamicina em filmes e revestimentos comestíveis

Filmes comestíveis	Aplicação em alimento	Fungo avaliado	Referência
Revestimento comestível à base de quitosana	Queijo ultrafiltrado iraniano	Bolores e Leveduras*	Nottagh <i>et al.</i> (2020)
Filmes a base de gelatina com nanopartículas de zeína/caseína carregadas de natamicina	N.A	Aspergillus niger, Botrytis cinerea e Penicillium citrinum	Mo <i>et al.</i> (2021)
Revestimento a base de amido de milho	Queijo semiduro	Penicillium spp.	González-Forte <i>et al.</i> (2019)
Filmes a base de gluten de trigo e hidróxi metil celulose	Queijo kashar fresco	Aspergillus niger e Penicillium roquefortii	Ture <i>et al.</i> (2011)
Filme à base de hidróxi etil celulose	Queijo mussarela de baixa umidade	Penicillium spp	Torrijos <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Autoria própria (2022).

Natamicina foi utilizada por González-Forte, Amalvy e Bertola (2019) adicionada ao revestimento a base de amido de milho para controle da contaminação por mofo em queijo semiduro durante a maturação, em específico o *Penicillium spp.* Na concentração de apenas 0,1% de natamicina maximizado para 70% com álcool polivinílico e poliuretano já ocorrem resultados inibitórios quanto à proliferação de *Penicillium spp.* e de fungos ambientais, isolados de fábricas de queijo com halos de inibição de até 32,5 mm.

Ture *et al.* (2011) usaram revestimentos à base de glúten de trigo com natamicina para diminuir o crescimento microbiológico em queijo fresco durante o armazenamento. Evidenciaram que a partir da utilização de 5 a 20 mg de natamicina para 10 g de revestimento, já reduziu cerca de 2 log na contagem de esporos, e, ocorreu uma eliminação eficaz de *Aspergillus niger* na superfície do queijo Kashar fresco após 30 dias de armazenamento a 10 °C quando 2 mg de natamicina foram usados por 10 g de solução do revestimento.

Há ainda a possibilidade de incorporação de natamicina à filmes ou revestimentos com adição de outros tipos de agentes antimicrobianos sem comprometer a eficácia das mesmas conforme Ollé Resa, Gerschenson e Jagus (2014) e Balaguer *et al.* (2014).

Ramos *et al.* (2012), produziram revestimentos comestíveis de proteína do soro de leite, glicerol, goma guar e óleo de girassol acrescentando natamicina (0,25 g/L) para acondicionar queijos. Os autores observaram que a presença de revestimento diminuiu a perda de água sendo 17 a 19% em 60 dias comparado à 27% sem cobertura. Diminuição da dureza e alterações de cor, e apenas após 20 dias ocorreu crescimento de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus spp.* e em 60 dias para *Pseudomonas spp.* O mesmo não inibiu bactérias ácido lácticas sendo uma vantagem comercial, inibindo apenas o crescimento de leveduras e bolores. O estudo comprovou a eficiência da aplicação de revestimento comestível antimicrobiano contendo natamicina.

O antimicrobiano natamicina tem sido utilizado por indústrias alimentícias para controle de microrganismos que se desenvolvem em produtos durante o período de maturação, porém sua aplicação fica limitada ao uso direto do antimicrobiano na superfície do alimento. Conforme demonstrado por Torrijos *et al.* (2022), alguns estudos foram realizados quanto a sua aplicação em forma de filmes e soluções filmogênicas. Observaram a atividade antifúngica da natamicina *in vitro em* cepas de

Penicillium com valores de CIM variando de 1,6 a 3,1 µg/mL e valores de CFM (Concentração fungicida mínima) variando de 12,5 a 200,0 µg/mL, e desenvolveram um filme comestível à base de hidroxietilcelulose para evitar o crescimento de *Penicillium* spp. em queijo mussarela de baixa umidade. Essa tecnologia pode ser considerada uma alternativa sustentável para prolongar a vida de prateleira e aumentar a segurança do queijo, controlando a taxa de respiração, retardando a oxidação lipídica e reduzindo a perda de massa e a proliferação microbiana, mantendo boas perspectivas para a utilização pelos produtores (COSTA *et al.*, 2018).

Tendo em vista a revisão da literatura apresentada, é possível identificar o uso de revestimentos comestíveis contendo a natamicina como uma alternativa viável de ser aplicada em queijos para controle da proliferação fúngica. A aplicação destes revestimentos junto da salmoura, etapa prévia à maturação ainda não foi explorada. No presente trabalho então foram explorados o efeito da presença do sal na solução filmogênica (propriedades do filme) bem como na aplicação em queijos (durante a maturação e efeitos na vida de prateleira).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As amostras de queijo minas meia cura, o agente antifúngico natamicina (95% de pureza em massa, grau alimentício, Prozyn®) placas de análise de bolores e leveduras *Compact Dry* (Compact DRY) e o NaCl (Cim Sal®), foram cedidos pelo Laticínios Latco Ltda.

Foram utilizados para o isolamento dos fungos os meios Petrifilm3M™ YM - Bolores e Leveduras e ágar Sabouraud (Kasvi). DMSO (dimetilsulfóxido (HIMEDIA®)) foi usado para diluir natamicina em análise de atividade antifúngica. Ágar Mueller-Hinton (Kasvi) foi utilizado no teste antibiograma disco-difusão para observar a resistência dos bolores selecionados em relação ao antimicrobiano.

Para elaboração da solução filmogênica foram aplicados os reagentes caseinato de sódio (Sigma Aldrich) e glicerol (Glicerina Bi Destilada – Bella Donna).

4.2 Isolamento e identificação presuntiva de fungo superficial de queijo maturado

O isolamento das colônias representativas do queijo em processo de maturação na temperatura de 8 a 11°C e umidade relativa de $75 \pm 2\%$, com aplicação de ozônio por todo o local a $0,2 \text{ mg/m}^3$ pelo período de 21 dias, seguiu o protocolo de swab de superfície (GONZÁLEZ-FORTE *et al.*, 2019). Um swab estéril umedecido com água peptonada tamponada 0,1%, foi friccionado em diferentes sentidos numa área de 10 cm^2 . Posteriormente, o swab foi transferido para um tubo de ensaio contendo água peptonada tamponada 0,1%, permanecendo em repouso por 1 hora. Posteriormente, 1 mL foi inoculado em placas de Petrifilm3M™ de Bolores e Leveduras e incubadas em estufa bacteriológica (Nova Ética) a 25 °C por 5 dias.

O morfotipo predominante foi selecionado e semeado em Batata-Dextrose-Ágar (BDA-Himedia) seguido de incubação a 28 °C por 7 dias. A identificação de fungos filamentosos foi baseada na associação de características macro e micromorfológicas da cultura. As características macroscópicas se basearam na textura, forma, superfície e reverso da colônia (GUPTA; RODRIGUEZ-COUTO, 2018).

Para a análise microscópica do fungo filamentoso, foi realizado a técnica de microcultivo, que consistiu em depositar um cubo de meio de cultura BHA sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri. Os fungos foram inoculados na parte superior do cubo de meio de cultura e após recoberto com uma lamínula esterilizada, seguido de incubação a 28 °C por 7 dias. Após este período, o material aderido na lamínula foi observado em microscópio óptico de luz em objetiva de 40 x, anotando as características quanto a presença ou ausência de hifas septadas, cores de hifas e disposição de esporos (hialinos ou demáceos). Estas características foram comparadas com a literatura (LACAZ *et al.*, 2002).

A análise microscópica da levedura ocorreu depositando uma gota de solução salina 0,1% em uma lâmina limpa seguida de uma alçada do fungo. A observação foi realizada em microscópio óptico de luz em objetiva de 40 x.

4.3 Análise da atividade antifúngica da natamicina

4.3.1 Preparo da solução de natamicina

A solução de natamicina foi preparada na concentração de 1024 µg/mL em DMSO: H₂O (85:15 v:v). A mistura foi agitada até dissolução completa, seguida de esterilização por filtração em membrana Millipore® 0,22 µm e mantida sob refrigeração até o momento de uso.

4.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) da natamicina contra o isolado fúngico

A avaliação da CIM foi realizada de acordo com o método descrito por Droby *et al.* (2003), com modificações. Um inóculo da cultura de fungos com 7 dias, foi depositado no centro de uma placa de Petri contendo meio BDA com diferentes concentrações de natamicina (256, 128, 64 e 32 µg/mL). O controle foi realizado em meio BDA sem natamicina. As placas foram incubadas a 25 °C e 37 °C, para fungo filamentoso e levedura, respectivamente, sendo observado o desenvolvimento fúngico a cada 24 horas. O teste foi feito em duplicata.

4.3.3 Efeito inibitório da natamicina na germinação de esporos e alongamento do tubo germinativo de levedura

O acompanhamento da inibição da germinação de esporos de fungo filamentosos e alongamento do tubo germinativo de levedura por natamicina seguiu protocolo descrito por Qin *et al.* (2003). Alíquotas de 10 mL de BHI (*Brain Heart Infusion*) com diferentes concentrações de natamicina (128 e 64 µg/mL) foram adicionadas em suspensões de 1 mL dos fungos testados, na concentração de 1×10^5 UFC/mL, e incubados a 25 °C e 37 °C, para fungo filamentosos e levedura, respectivamente. O acompanhamento da germinação foi realizado nos tempos 0, 8 e 24 horas, sendo retirado uma alíquota de 10 µL e espalhada na superfície de uma lâmina, seguido de observação em microscópio óptico de luz em objetiva de 40 x.

Aproximadamente 100 esporos ou células, de cada fungo, foram quantificados quanto à taxa de germinação e formação do tubo germinativo. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

4.4 Preparo da solução filmogênica

Foram preparadas 4 soluções filmogênicas distintas para avaliação, sendo a FC a formulação controle, FCNa a formulação controle com adição de NaCl, FN a formulação contendo natamicina e FNNa a solução contendo natamicina e NaCl. Inicialmente foram pesados em balança semi-analítica todos os reagentes necessários para elaboração.

Os valores de Natamicina, NaCl e água foram estipulados baseando-se na aplicação já realizada industrialmente, adaptando para a quantidade de amostra utilizada. Para o preparo de todas as formulações das soluções filmogênicas, utilizou-se 5000mL de água, 250g de Caseinato de Sódio e 50g de Glicerol. Para as Soluções FN e FNNa acrescentou-se 2,5g de Natamicina, e, para FCNa e FNNa foi acrescentado 83,75g de NaCl.

O glicerol foi aquecido até atingir 80 °C em uma chapa de agitação com aquecimento e controle de temperatura (C-MAG HS7, IKA). Nas formulações contendo natamicina, esta foi adicionada e manteve-se a homogeneização magnética por 15 minutos até dissolução. Por fim, a solução foi resfriada até temperatura

ambiente. Nas formulações sem a adição de natamicina, o glicerol foi aquecido da mesma forma.

Para solubilização do caseinato de sódio, a água destilada foi aquecida até atingir a temperatura de 90 °C e adicionou-se o caseinato de sódio vagarosamente em pequenas porções enquanto ocorria a solubilização.

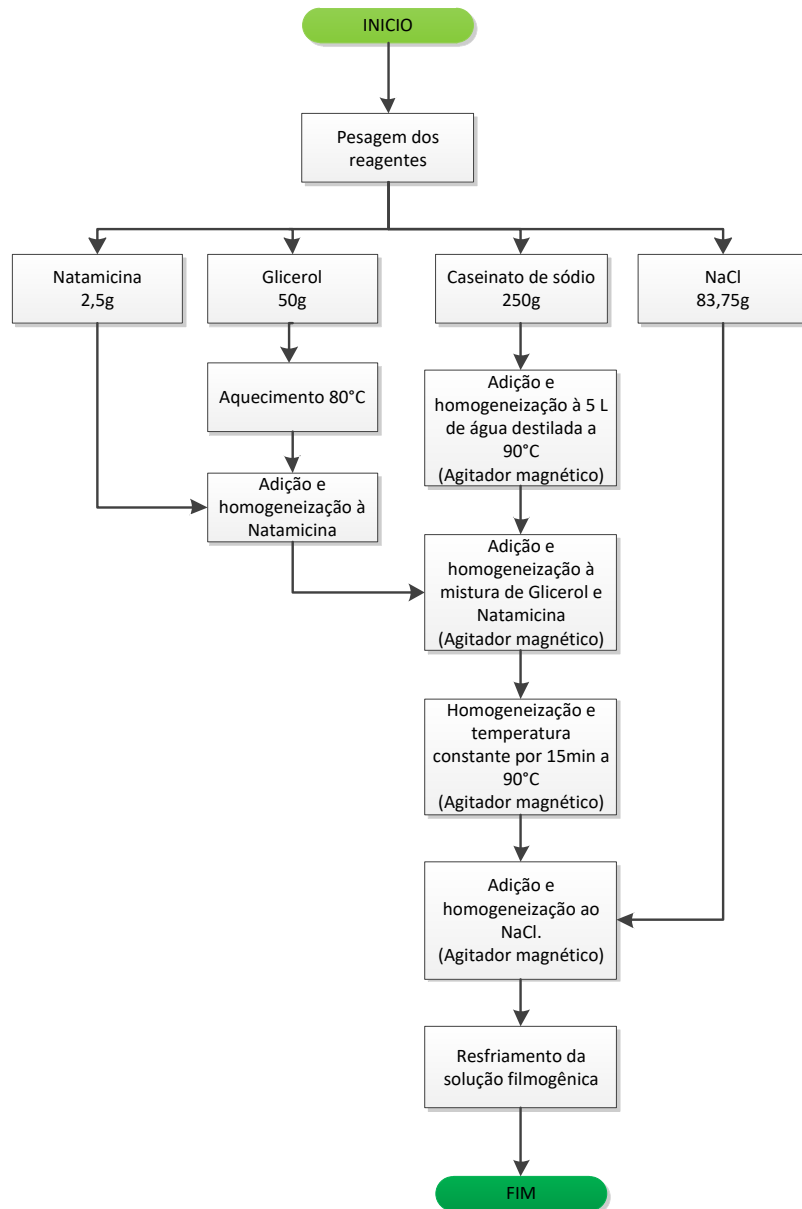
Após completa homogeneização a temperatura foi reduzida à 80 °C e o glicerol (contendo ou não a natamicina) foi adicionado e a mistura agitada por mais 15 minutos. Ao final, adicionou-se o NaCl, quando utilizado. A solução filmogênica então foi vertida em formas de teflon (Figura 2) e levadas para secagem em estufa de convecção forçada a 40 °C (Cienlab) por 24 h. Os filmes foram retirados das formas e armazenados em pacotes de polietileno fechados. Todas as formulações foram preparadas em duplicata. Um esquema ilustrativo das etapas utilizados no preparo está apresentado na Figura 3.

Figura 2 - Fotografia das soluções filmogênicas depositadas em formas de Teflon



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 3 - Fluxograma do processo de elaboração da solução filmogênica



Fonte: Autoria própria (2022).

4.5 Caracterização físico-química dos filmes

4.5.1 Propriedades mecânicas (força de punção)

Para a determinação da força de punção das amostras de filme testadas, foi utilizado o aparelho texturômetro TA.XT Express Enhanced (Stable Micro Systems) de acordo com a norma F 1306 – 90. As amostras de filme foram cortadas em pedaços retangulares (8 cm x 8 cm, 6 amostras de cada filme) e pré-condicionadas em

dessecador com umidade relativa de 50 ± 5 % (solução saturada de nitrato de cálcio) a 23 ± 2 °C por uma semana. Foi utilizado para a análise o probe SMS P/5S com 1 mm/s de velocidade de penetração. Também foi registrada a área sob a curva, que representa a energia absorvida pelo material durante o ensaio (HA e LU, 2020).

4.5.2 Cor – delta E

Para análise da coloração dos filmes obtidos foi utilizado aparelho Colorímetro Delta Vista 450G (Delta Color), conforme as coordenadas internacionais CIE (*International Commission on Illumination*), L^* , que representa a luminosidade ($L^* = 0$ é preto e $L^* = 100$ é branco), a^* e b^* , que indicam a direção das cores sendo $+a^* =$ vermelho e $-a^* =$ verde; $+b^* =$ amarelo e $-b^* =$ azul, C^* indica o “croma”(C* é 0 no centro e aumenta conforme a distância deste), e h é um ângulo de tonalidade, ou ângulo de Hue. Para cada amostra foi realizada a leitura com 6 repetições, colocando uma folha de coloração branca como base (abaixo da amostra) em todas as leituras dos filmes.

4.5.3 Solubilidade em Água

Para determinar a solubilidade em água (% SOL), foi utilizada a metodologia de Da Silva *et al.* (2019), em que amostras de filme (2×2 cm) foram pesados (w_1) e logo após, imersos em água destilada (200 mL, 25 ± 2 °C) durante 24 horas. Após esse período as amostras foram retiradas e encaminhadas para secagem em estufa com ar forçado a 70 °C por 24 horas. As amostras foram então pesadas (w_2) e a solubilidade em água (%) foi calculada usando a Equação (1).

$$\% \text{ SOL} = \frac{(w_1 - w_2)}{w_1} \times 100 \quad (1)$$

4.5.4 Permeação ao Vapor d'Água

A análise foi realizada de acordo com a norma da *American Society for Testing and Material* ASTM E96M (2012). Os filmes testados foram cortados em formato circular com diâmetro de 60 mm, cada espessura foi medida com auxílio de um paquímetro e anotada, sendo encaminhados para o dessecador a 25 °C pelo período de 48 horas com umidade controlada a 53 % utilizando solução saturada de nitrato de magnésio hexahidratado.

Após esse período os mesmos foram fixados em cápsulas de alumínio nas quais contém em seu interior uma quantidade padronizada de cloreto de cálcio anidro ($UR_1 = 0\%$) seco em estufa (100 °C) com antecedência. Com o objetivo de cada cápsula ser vedada corretamente, foram coladas borrachas para auxiliar na fixação do filme e graxa de silicone permitindo o rosqueamento completo da tampa.

As cápsulas foram pesadas a cada 12 horas durante 5 dias, mantendo o sistema das cápsulas em um dessecador com umidade de $UR_2 = 75\%$ a 25 °C durante o tempo de análise. Os dados de ganho de massa, m (g), tempo de análise, t (dias) e área superficial do filme circular, A (m^2), foram utilizados para o cálculo da taxa de permeabilidade de vapor d'água, TPVA ($g/m^2 \cdot dia$) (Equação 2). A partir dos resultados de TPVA, a Permeabilidade ao vapor d'água foi calculada, com a Equação (3), onde e (mm) é a espessura do filme, P (kPa) é a pressão de saturação da água e o gradiente de umidade relativa entre o exterior da cápsula (UR_2) e o interior (UR_1). A análise foi realizada em triplicata.

$$TPVA = \frac{m}{t \times A} \quad (2)$$

$$PVA = \frac{TPVA \times e}{P \times (UR_2 - UR_1)} \quad (3)$$

4.5.5 FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier)

As análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FTIR, Shimadzu IRAffinity¹) foram realizadas para observar a existência de possíveis interações químicas entre os componentes dos filmes utilizados na produção dos revestimentos.

Para as análises os filmes foram mantidos em dessecador com sílica pelo período de 24 horas. Os espectros foram obtidos com o uso de um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*, cristal de ZnSe, Pike ATR-HATR *flat plate*). As amostras foram avaliadas na faixa de 700–4000 cm^{-1} , usando 32 acumulações e resolução de 2 cm^{-1} . As bandas foram normalizadas para possibilitar a comparação entre as amostras no software Matlab (R2021a, Matworks).

4.5.6 DRX (Difração por Raio-X)

A cristalinidade dos filmes foi avaliada por difração de raio-X. Os difratogramas foram obtidos usando um difratômetro de raio-X (Shimadzu, LabX XRD-6000). A velocidade da varredura foi de 5,9 $^{\circ} \text{min}^{-1}$, utilizando uma variação em 2θ de 2 $^{\circ}$ a 60 $^{\circ}$. Para tanto, foi usada radiação de cobre $K\alpha$ ($\lambda = 1,5433 \text{ \AA}$) a 40 kV e 53 mA.

4.5.7 Aplicação da solução filmogênica nos queijos e análises durante a maturação

A aplicação nos queijos de dimensão 9,5 x 9,5 x 53 cm foi realizada somente com a solução filmogênica FNa (contendo natamicina e NaCl) preparada conforme descrito no item 4.4 e comparada com o queijo tratado somente com a salmoura. Após o preparo, a solução filmogênica foi transferida para um recipiente apropriado, no qual foram colocadas as amostras de queijo minas meia cura do mesmo lote de modo que o queijo ficasse mergulhado e já retirado após a solução abranger toda a superfície, conforme a Figura 4, sendo essas as amostras com solução filmogênica (AF). O mesmo procedimento foi realizado para as amostras controle (AC), contudo a solução onde as amostras foram mergulhadas continha somente a solução de NaCl (na mesma concentração presente na solução filmogênica). Os tratamentos AF e AC foram aplicados em duplicata.

Após terem sido envolvidos pela solução em todas as faces, os queijos foram transferidos para caixas de polietileno brancas lavadas e sanitizadas para que o excesso da solução escorresse. As amostras foram direcionadas à câmara de maturação com monitoramento da temperatura de 8 a 11 $^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 75 \pm 2 %, com aplicação de ozônio por todo o local a 0,2 mg/m^3 . Após 1 dia da secagem

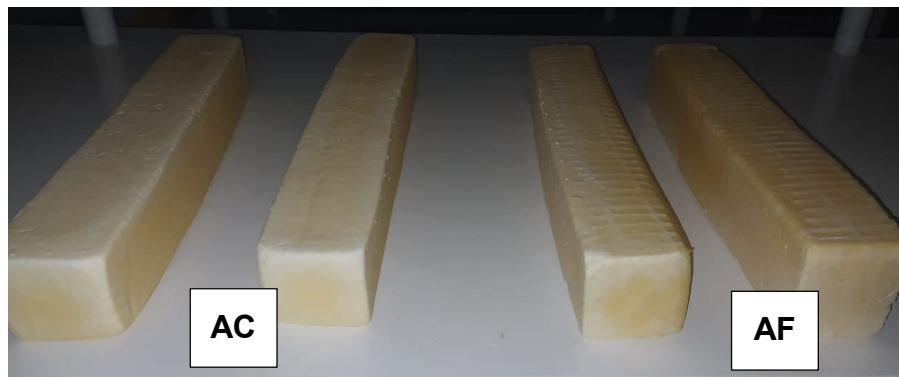
preliminar do recobrimento composto pelo filme, as amostras foram transferidas para as prateleiras de maturação e mantido (Figura 5) pelo tempo de 21 dias.

Figura 4 - Aplicação da solução filmogênica nos queijos



Fonte: Aatoria própria (2022).

Figura 5 - Amostras de Queijo Minas Meia Cura na câmara de maturação. Amostra controle (AC) e amostra contendo solução filmogênica (AF)



Fonte: Aatoria própria (2022).

Durante o tempo de maturação, as amostras foram monitoradas virando as mesmas 3 vezes por semana em sentido horário para uniformização da casca. Em cada viragem foi feita a conferência visual quanto às rachaduras, presença de material estranho (sujidades) e/ou presença de mofo interno, o qual pode ser observado caso ocorrer rachaduras na superfície do queijo.

Semanalmente foi feita a pesagem de cada peça utilizando a balança digital (Toledo) e realizada o cálculo do percentual utilizando a Equação (4) condizente à perda de massa das amostras expostas.

$$\text{Perda de massa} = 100 - \left(\frac{100 \times mx}{mo} \right) \quad (4)$$

Sendo M_0 a massa inicial da amostra no primeiro dia de aplicação da solução filmogênica e M_x a massa no dia da coleta de swab, para a análise microbiológica da superfície dos queijos.

Para a enumeração de bolores e leveduras, seguiu-se a metodologia APHA 21:2015 para contagem de bolores e leveduras em alimentos. Foi utilizado o ágar Dichloran Rose Bengal Agar (DRBC) com plaqueamento em superfície e as placas foram incubadas (sem inverter) por cinco dias a 25°C (APHA, 2015). Os resultados foram expressos em log UFC/g de amostra.

4.5.8 Análises das amostras de queijo maturado – *shelf life*

As amostras de queijo após concluírem o tempo de maturação foram encaminhadas para o procedimento de toaleta, as quais, com o auxílio de uma espátula de raspar de aço inox, tiveram toda a sua superfície verificada e raspada, retirando toda possível anomalia, como o desenvolvimento de bolores, leveduras, sujidades e o próprio filme no caso da amostra AF. O excesso retirado foi pesado e descartado em lixo orgânico. As amostras foram acondicionadas em suas embalagens primárias próprias a vácuo e averiguadas quanto às alterações de sua coloração e textura mensalmente como também o desenvolvimento fúngico, pelo período de 8 meses de *Shelf-Life*.

A cor foi mensalmente verificada conforme a metodologia descrita no item 4.5.2, na superfície dos queijos. Além disso, foi calculada a diferença de cor (Delta E) entre a amostra AC e AF para cada intervalo de tempo, com a Equação (5), onde os subscritos AC e AF representam as amostras controle e tratadas com o filme durante a maturação.

$$\Delta E = \sqrt{(a_{AC}^* - a_{AF}^*)^2 + (b_{AC}^* - b_{AF}^*)^2 + (L_{AC}^* - L_{AF}^*)^2} \quad (5)$$

A análise de textura foi também efetuada mensalmente utilizando o aparelho texturômetro TA.XT *Express Enhanced* (Stable Micro Systems), com relação a Força de Punção (N) no centro do queijo (6 pontos conforme o padrão da Figura 6) e na superfície das amostras (em todas as laterais). Foi utilizado para a análise o probe

SMS P2/5S com 1 mm/s de velocidade de penetração e as amostras foram puncionadas a 10 mm de profundidade.

As análises microbiológicas de contagem de bolores e leveduras foram realizadas consoante o item 4.6.2.

Figura 6 - Pontos perfurados no centro do queijo na análise de força de punção



Fonte: Aatoria própria (2022).

O queijo maturado também foi avaliado quanto a sua composição centesimal, averiguando umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e carboidratos, pela metodologia descrita em Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.6 Análises estatísticas

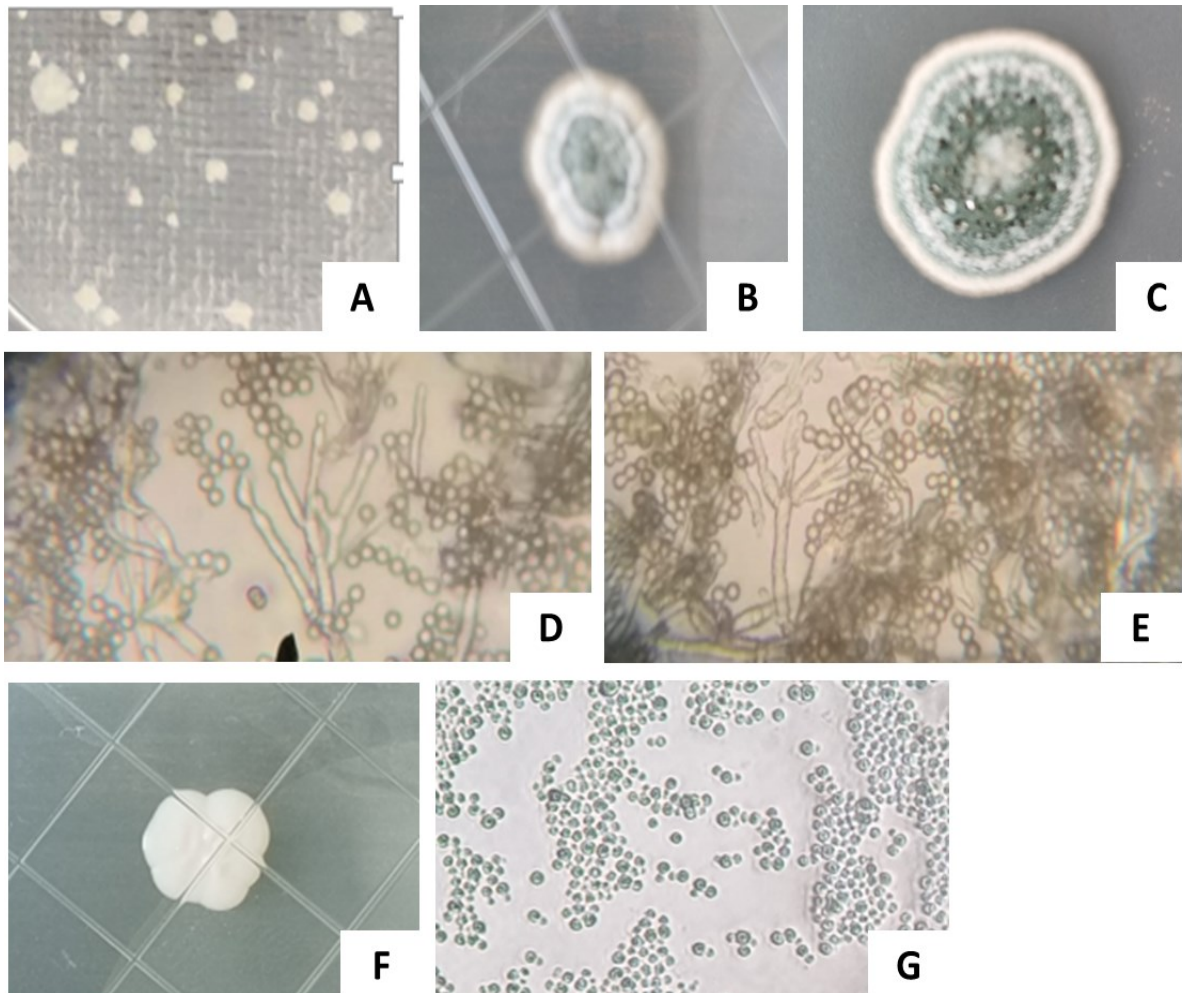
Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas das amostras de queijo e de filmes foram expressos pela média \pm desvio padrão. Os dados foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância ANOVA e Teste de Tukey, ou teste *t-Student*, considerando as amostras como fonte de variação. Utilizou-se o critério estatístico ao nível de significância de 5% pelo programa Matlab.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolado fúngico

No teste de isolamento de fungo da superfície do queijo maturado, foi observada a predominância de uma espécie de fungo filamentososo e levedura, sendo isolado uma colônia aleatória e nomeada de F1 e L1.

Figura 7 - (A) Características do crescimento fúngico em Compact Dry; Características macroscópicas do fungo F1: (B) 5 dias de incubação; (C) 10 dias de incubação; (D, E) destaque para as hifas hialinas septadas e conídios - Aumento 400 x; (F) característica colônias da levedura L1; (G) característica microscópica do isolado L1 – Aumento 400 x



Fonte: Autoria própria (2023).

Na análise macro e micromorfológica do fungo filamentososo, notou-se a colônia de aspecto veludoso, lisa na periferia e rugosa no centro, com esporos aparentes após

7 dias de incubação (Figura 7 A, B e C) (GUPTA; RODRIGUEZ-COUTO, 2018). A característica microscópica a partir da técnica de microcultivo, apresentou amplas redes ramificadas de hifas septadas e hialinas, que se conectam formando então o micélio fúngico (figura 7 D e E). No final de cada ramificação há unidades esféricas de conídios ovalados dispostos em fileira. Esses propágulos exercem um papel significativo na reprodução desses fungos, pois são a principal estratégia de dispersão desses microrganismos (WEBSTER e WEBER, 2007).

Devido à disposição dos conodióforos, é putativo se tratar do gênero *Penicillium* (PITT; HOCKING, 1997; LACAZ *et al.*, 2002). Diversos autores relataram o gênero *Penicillium* como fungo contaminante predominante em queijo maturados (FAJARDO *et al.*, 2010; PINTADO *et al.*, 2010; YANGILARA; YILDIZ, 2016). O isolado L1 apresentou colônias de aspecto cremoso, bordas regulares ou irregulares com coloração creme e blastoconídios ovalados (LACAZ *et al.*, 2002).

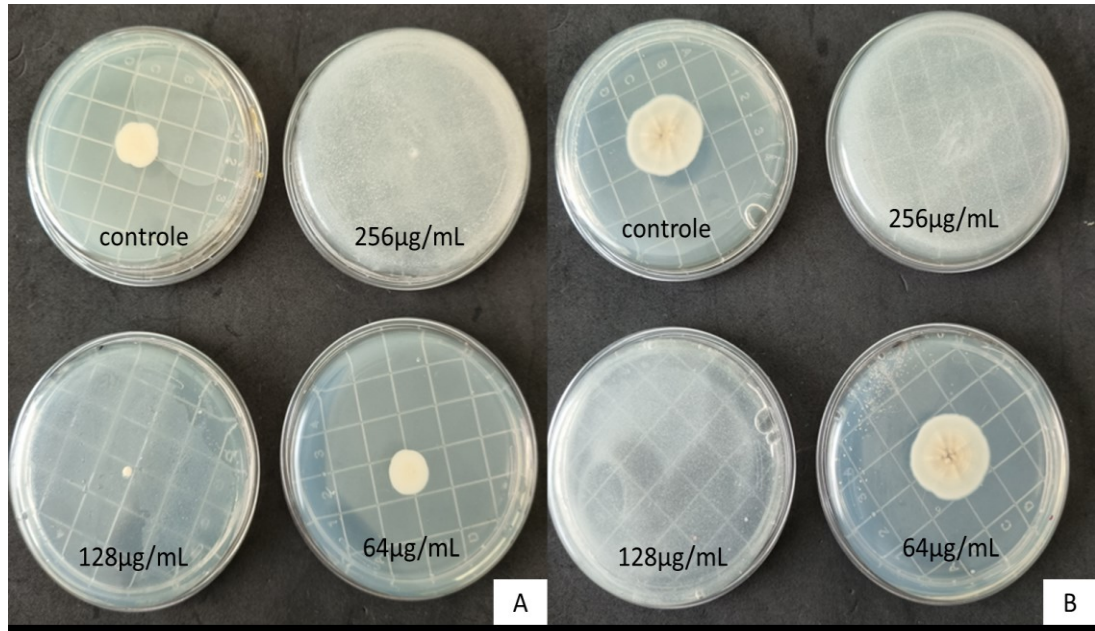
5.2 Concentração inibitória mínima da natamicina

A CIM da natamicina frente aos fungos F1 e L1 foi de 128 µg/mL, sendo acompanhado por 8 dias de incubação. As expansões das colônias foram realizados nos tempos T2, T4 e T8 dias, e na Figura 8 é apresentado o crescimento das colônias no controle e nas concentrações de 256, 128 e 64 µg/mL, após os 8 dias de incubação, evidenciando que na concentração da CIM o crescimento de colônias apresentaram comportamento semelhante ao observado no controle (sem natamicina). O isolado L1 apresentou um residual de colônia, sem evoluir durante os tempos testados, portanto foi considerado como ausência de crescimento. A Figura 9 mostra o tamanho da colônia (cm) nos tempos de 2, 4 e 8 dias, bem como as concentrações testadas.

Os valores de CIM em isolados fungicos são variáveis, tanto em testes *in vitro* como *in situ*, ou seja, aplicados a filmes antimicrobianos. Türe *et al.* (2008) relataram valores de CIM de 200 µg/mL para *A. niger* e 100 µg/mL para *P. roquefortii*, em filme metil celulose e glúten. Fajardo *et al.* (2010) também relataram valores mais elevados de natamicina (500 µg/mL) em filme de quitosana para controlar fungos em queijo semi-duro. Lantano *et al.* (2014) utilizaram valores ainda maiores de natamicina, chegando a concentração de 1,25 mg/mL, para controlar fungos em queijos. Em síntese, os valores relatados na literatura foram superiores aos encontrados neste

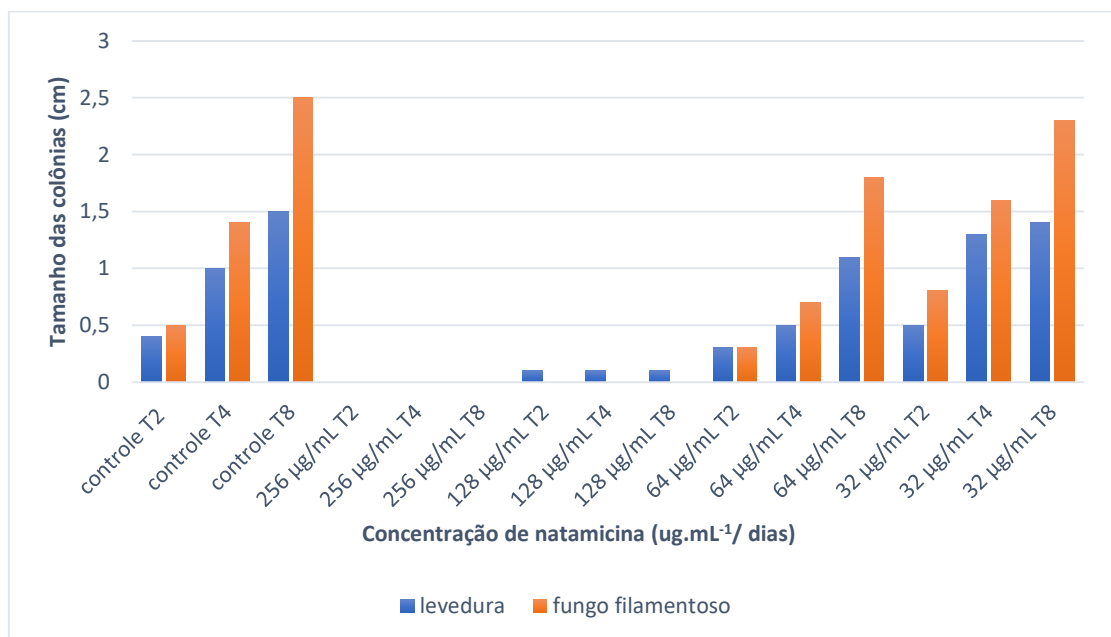
estudo, revelando que o fungo Q1 não apresentou resistência a natamicina, portanto, é facilmente controlado nas condições testadas.

Figura 8 - Efeito da natamicina sobre o crescimento dos fungos (A) levedura e (B) filamentoso, em meios contendo natamicina



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 9 - Diâmetro da colônia (cm) de levedura e fungo filamentoso, durante os dias de tratamento com natamicina (ug/mL)



Fonte: Autoria própria (2023).

Em diversos países a natamicina é permitida como antifúngico em superfícies e tratamentos de queijo duros, semiduros e semimoles, sendo designada como conservante E235 (KALLINTERI *et al.*, 2013; LANTANO *et al.*, 2014).

A natamicina é um agente antimicótico polieno macrólido produzido por fermentação submersa de cepas de *Streptomyces natalensis* e *S. chattanogenesis* (MEENA *et al.*, 2021). O modo de ação da natamicina é diferente contra leveduras e bolores, porém, todos esses modos são dependentes do ergosterol. Em fungos filamentosos, a natamicina liga-se irreversivelmente ao ergosterol na membrana citoplasmática, formando um complexo de polieno-esteróis. Este complexo altera a permeabilidade da membrana, resultando no vazamento de íons essenciais e peptídeos, resultando na cessação do crescimento do fungo (TE WELSCHER *et al.*, 2008), devido aos distúrbios causados nos transportes de nutrientes para essas células (APARICIO *et al.*, 2016). Já em leveduras, a natamicina interfere no processo de formação da membrana dos vacúolos (dependentes de ergosterol), resultando em vazamento de íons de potássio, levando a morte da célula (KATO *et al.*, 2001).

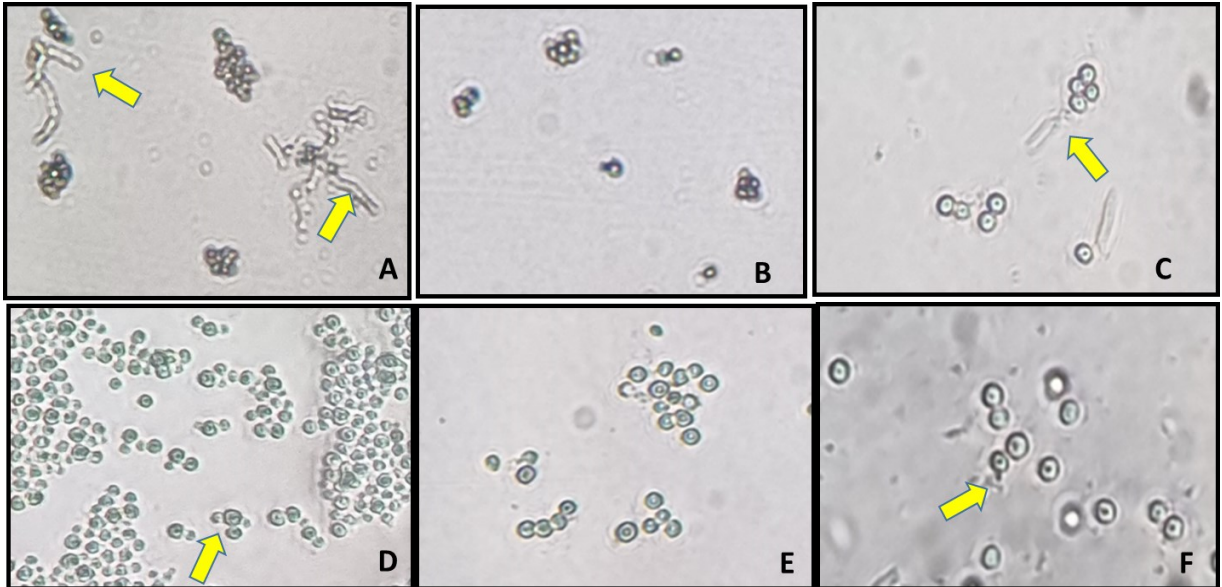
Independente da concentração de uso da natamicina, seu efeito é o mesmo sobre a célula fúngica. Apresenta ainda baixa toxicidade para células humanas e de outros mamíferos quando utilizada contra bolores e leveduras (ARIMA *et al.*, 2014).

5.3 Inibição da germinação e brotamento

O efeito da natamicina na germinação de esporos e alongamento dos blastoconídeos (células leveduriformes) está apresentado na Figura 10. Os esporos foram considerados germinados quando ocorreu formação de tubo germinativo, e os blastoconídeos apresentaram brotamento (gemulação). A inibição foi correlacionada com a concentração de natamicina, segundo os valores da CIM obtidos no teste em placa. Tanto a germinação dos esporos quanto a célula leveduriforme foram completamente inibidos pelo antifúngico a 128 µg/mL.

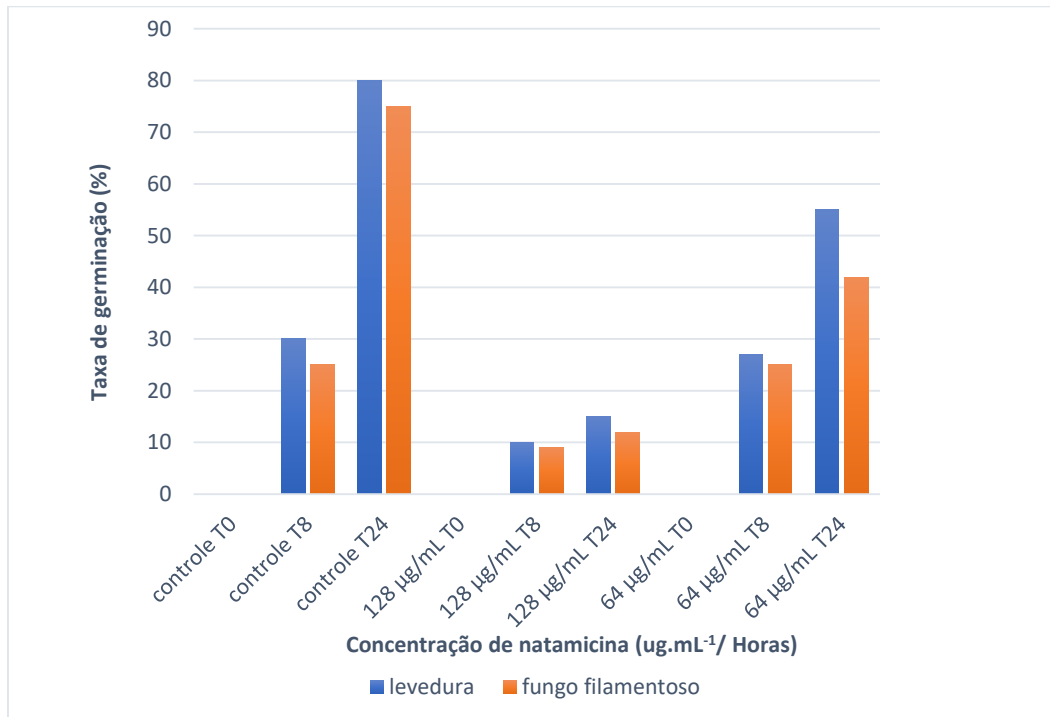
Na concentração de 64 µg/mL o desenvolvimento fúngico foi menor que o controle após 24 horas de incubação, sendo 44 e 31% para o isolado F1 e L1, respectivamente, isso indica que mesmo resistente à concentração, o processo de germinação foi menor.

Figura 10 - Efeito da natamicina na germinação de esporos e leveduras após 24 horas de incubação. (A) controle do fungo filamentososo sem natamicina; (B) fungo filamentososo com 128 µg/mL de natamicina; (C) fungo filamentososo com 64 µg/mL; (D) controle da levedura; (E) levedura com 128 µg/mL de natamicina; (F) levedura com 64 µg/mL de natamicina; Seta amarela mostra a formação de tubo germinativo para fungo filamentososo e brotamento para levedura



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 11 - Percentual (%) de germinação do fungo filamentososo e levedura nos tempos 0, 8 e 24 horas



Fonte: Autoria própria (2023).

Resultado semelhante na taxa de germinação com natamicina foi obtido por He *et al.* (2019), com os fungos *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*, isolados de uva. Foi observado que maior concentração de natamicina diminuía a germinação dos esporos fúngicos. Os mesmos autores revelaram que os fungos analisados perderam a integridade da membrana citoplasmática após incubação com a natamicina, influenciando no processo de germinação.

Contudo, são poucas as publicações disponíveis sobre a atividade antimicrobiana da natamicina contra fungos isolados de queijo. Neste estudo, observamos que a natamicina inibiu a germinação de esporos e o crescimento leveduriforme em concentrações superiores a CIM, indicando que o efeito pode estar diretamente relacionado à sua atividade antifúngica.

5.4 Caracterização físico-química dos filmes

Os resultados obtidos a partir das análises de propriedades mecânicas (Força de Punção), solubilidade em água (SOL %), permeação ao vapor d'água (PVA) realizadas nos filmes estão na Tabela 4.

Os resultados de força de punção não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras de FC e FN e entre as amostras FCNa e FNNa. Todas as amostras apresentaram comportamento semelhante para área sob a curva, sem diferença significativa. Este resultado demonstra que a adição de NaCl na solução filmogênica afetou de forma significativa as propriedades mecânicas do filme de caseinato de sódio ($p < 0,05$), além disso, a natamicina não interferiu, quando comparado aos controles (com e sem NaCl). A presença de NaCl diminuiu a resistência à punção e diminuiu também a energia absorvida pelo mesmo (área sob a curva). A presença do NaCl se faz necessária na formulação a ser aplicada nos queijos, pois faz parte do processo já utilizado industrialmente antes da maturação, por isso o efeito da sua presença foi avaliado.

Tabela 4 - Resultados de Força de Punção (FP), área sob a curva de punção (ASCP), permeabilidade ao vapor d'água (PVA) e solubilidade (SOL) dos filmes de caseinato de sódio. Formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa)

Formulação	FP (N)	ASCP (N.s)	PVA ($\times 10^{-8}$ g/m.Pa.h)	SOL (%)
FC	23,306 ^a \pm 1,789	22,083 ^a \pm 1,633	8,352 ^a \pm 0,109	22,769 ^a \pm 0,406
FCNa	4,799 ^b \pm 0,319	6,799 ^b \pm 1,192	28,040 ^b \pm 4,822	41,382 ^b \pm 1,603
FN	28,924 ^a \pm 3,220	22,777 ^a \pm 3,267	9,918 ^a \pm 0,660	25,844 ^a \pm 0,810
FNNa	6,124 ^b \pm 0,566	9,693 ^b \pm 0,614	46,720 ^c \pm 0,930	49,650 ^c \pm 1,300

Médias \pm desvios padrão das amostras; ^{a,b,c} letras sobrescritas diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022).

O cloreto de sódio é utilizado como agente de formação de poros na síntese de hidrogéis e materiais reticulados (VAN BOCHOVE; GRIJPMA, 2021) e como agente de regulação de umidade (SÄNGERLAUB *et al.*, 2018), sendo seu uso para estes fins associados a uma redução nas propriedades mecânicas de tração e alongação. Sivanasvaran *et al.* (2021) afirmam que o cloreto de sódio (5,0-10,5 mM p/v), assim como o glicerol (0,5-2,0% v/v), teve efeito nas propriedades mecânicas de filme de quitosana incorporado com extrato de *Garcinia atroviridis*, causando redução na alongação na ruptura e na resistência à tração. No caso do presente trabalho, a proporção de NaCl utilizada na solução filmogênica possivelmente causou perda de continuidade na matriz polimérica do filme, composta pelo caseinato de sódio.

Os resultados de permeabilidade ao vapor d'água demonstraram o mesmo padrão para as amostras com e sem natamicina, sem NaCl ($p < 0,05$). Romero *et al.* (2016) observaram diferença significativa na PVA para os filmes com e sem natamicina. A incorporação de natamicina reduziu o valor de permeabilidade ao vapor d'água dos filmes de farinha de tritcale. Esse resultado pode estar relacionado à baixa solubilidade em água da molécula de natamicina, sendo o mesmo efeito observado por Ollé Resa, Gerschenson e Jagus (2014) para filmes comestíveis de amido de mandioca.

A permeabilidade ao vapor de água do filme depende principalmente de sua estrutura química e morfologia (MIR *et al.*, 2018). Possivelmente no presente trabalho este efeito não foi observado pelo procedimento de inicial de solubilização da natamicina no glicerol previamente à adição na água. O procedimento geral adotado para sua incorporação à solução filmogênica é de adição direta à água, contudo, como

possui baixíssima solubilidade em água (0,058 mg/mL) (VELPANDIAN *et al.*, 2021), sua distribuição não deve ser homogênea.

A presença de NaCl influenciou significativamente ($p < 0,05$) a PVA nas amostras com e sem natamicina. Comparativamente, o valor de PVA da amostra FNNa é de 1,67 vezes o valor determinado para a amostra FCNa. Zalazar *et al.* (2019) observaram uma redução na atividade antimicrobiana da natamicina frente a *Zygosaccharomyces bailii* quando na presença de goma xantana e NaCl, podendo ocorrer interações entre a natamicina e fatores ambientais e agentes estabilizantes, tal como ocorreu a interação da natamicina e os demais componentes da solução filmogênica deste trabalho sendo notável o efeito conjunto da presença da natamicina e NaCl no aumento da PVA, em contrapartida, ainda não há relatos na literatura para tal argumentação.

O mesmo padrão encontrado para os resultados de PVA foi determinado para a solubilidade dos filmes. Uma vez que o NaCl representa aproximadamente 30 % em peso do teor de sólidos da solução filmogênica, espera-se o aumento na solubilidade do material. O efeito de interação entre natamicina e NaCl também é evidenciado na solubilidade, que foi 1,2 vezes maior para FNNa quando comparado a FCNa.

A solubilidade descreve a resistência à água dos filmes quando aplicados nos produtos e pode direcionar a aplicação do revestimento (CERQUEIRA *et al.*, 2012). As soluções filmogênicas se tornam dependentes de sua afinidade pela água, caso o destino almejado for proteger a integridade do produto sendo resistente à água, a mesma irá requerer uma maior porcentagem de insolubilidade (ARORA e PADUA, 2010).

Os resultados de solubilidade encontrados por Romero *et al.* (2016) indicaram que a incorporação de natamicina aos filmes obtidos da farinha de triticales não desestabilizou a estrutura estável da rede do filme e não aumentou o volume livre e a mobilidade das cadeias poliméricas.

Os dados experimentais de cor das amostras de filme estão apresentados na Tabela 5. Todos os filmes analisados apresentaram, visualmente, leve transparência, sendo flexíveis e homogêneos, não destacando solutos dispersos. Não apresentavam rachaduras ou presença visível de rachaduras e/ou poros, este mesmo aspecto foi identificado para os filmes produzidos por Ramos *et al.* (2012) e Romero *et al.* (2016).

Tabela 5 - Valores experimentais da determinação dos parâmetros de cor das amostras formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa)

Formulação	L*	a*	b*	C*	h*
FC	89,06 ^a ± 0,34	-1,23 ^b ± 0,10	2,36 ^b ± 0,31	2,67 ^b ± 0,32	118,16 ^c ± 1,49
FCNa	88,69 ^a ± 0,32	-1,38 ^b ± 0,11	4,20 ^b ± 0,64	4,44 ^b ± 0,63	109,65 ^b ± 2,28
FN	88,37 ^a ± 0,56	-2,12 ^a ± 0,15	8,68 ^a ± 1,02	8,94 ^a ± 1,02	104,11 ^{ab} ± 0,87
FNNa	87,98 ^a ± 0,88	-2,42 ^a ± 0,12	12,19 ^a ± 1,57	12,44 ^a ± 1,55	101,86 ^a ± 1,19

Nota: Médias ± desvios padrão das amostras em triplicata; ^{a,b,c}letras sobrescritas diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autoria própria (2022).

Os valores de L* indicaram que as amostras apresentaram alta luminosidade, sendo todos semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$). Sua alta luminosidade também é efeito devido ao fundo padronizado de coloração branca que foi utilizado para realizar a leitura, colocado embaixo das amostras, o que também demonstra a transparência dos filmes.

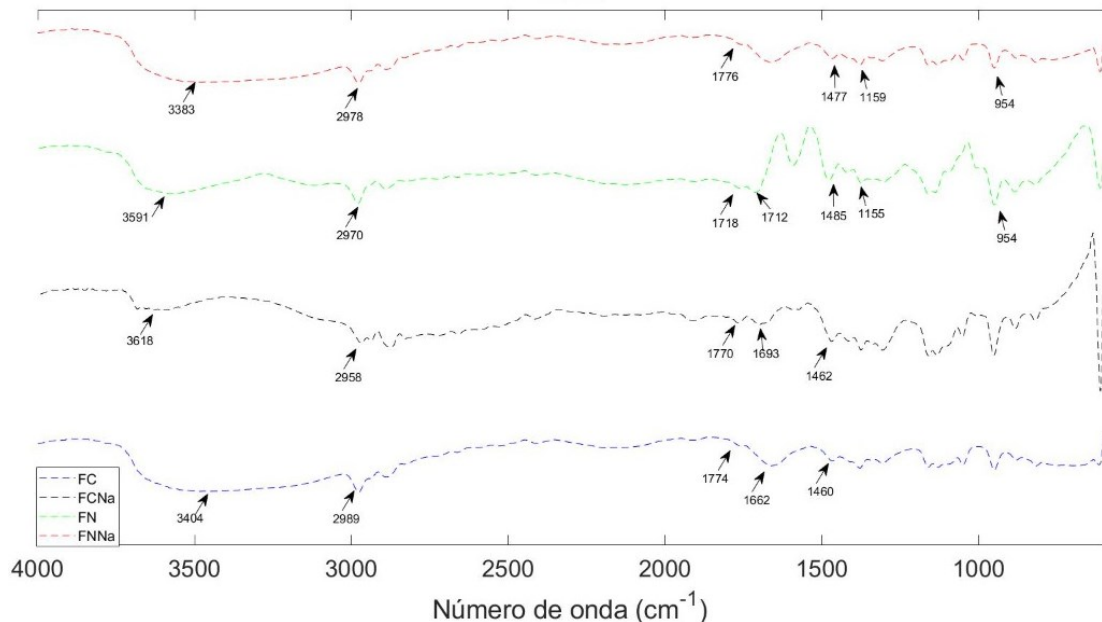
A cor dos filmes é uma característica importante uma vez que os consumidores são atraídos pela aparência externa dos produtos (ROMERO *et al.*, 2016). Para os parâmetros a*, b* e C*, observou-se um comportamento semelhante para as amostras. Foi detectada semelhança significativa entre as amostras FC e FCNa ($p > 0,05$) e entre FN e FNNa ($p > 0,05$). Por outro lado, detectou-se que FC e FCNa são diferentes de FN e FNNA ($p < 0,05$). Os valores de a* e b* representam as coordenadas que vão de verde a vermelho e de azul a amarelo, respectivamente. O parâmetro C*, croma, indica a pureza da cor (MCGUIRE, 1992). As amostras contendo natamicina apresentaram coloração tendendo ao amarelo (maiores valores de b*) o que é uma característica deste antimicrobiano, e verde (menores valores de a*), assim o valor de croma também foi deslocado para maiores valores, indicando uma cor mais pura. No caso dos filmes sem adição de natamicina a coloração foi mais neutra.

No estudo de Mo *et al.* (2021) foi averiguado que filmes nanocompósitos à base de gelatina antifúngica com nanopartículas de zeína/caseína carregadas de natamicina tiveram aumento no valor de b* com a incorporação das nanopartículas, tendo alteração da coloração de transparente para amarelo, conforme observado no presente trabalho.

Quanto ao ângulo de hue ($^{\circ}$ h), que indica a saturação da cor, notou-se uma redução do valor quando os filmes foram adicionados de natamicina. Essa alteração indica uma tendência à mudança de coloração amarelo claro para amarelo vibrante.

As amostras de filmes foram avaliadas por FTIR-ATR para determinar a interação entre os componentes presentes nas formulações. Os resultados estão apresentados na Figura 12. Primeiramente, percebeu-se a presença da natamicina nos filmes pelas suas bandas características (éster conjugado e éter) indicando que ela não foi degradada no preparo das amostras FNNa e FN.

Figura 12 - Espectros de FTIR-ATR das amostras de filmes formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa)



Fonte: Autoria própria (2022).

Foi detectada a banda relativa ao éster conjugado da natamicina nos espectros das amostras FN em 1712 cm^{-1} , e na amostra FNNa a banda apresentou um deslocamento para a direita, localizada em 1670 cm^{-1} . Além disso, essas bandas das amostras FN e FNNa apresentam uma menor intensidade quando comparada as bandas da mesma região espectral das amostras FC e FCNa. Isto provavelmente se deve por haver sobreposição das bandas de amina primária do caseinato que estão localizadas em 1662 e 1693 cm^{-1} para FC e FCNa, respectivamente.

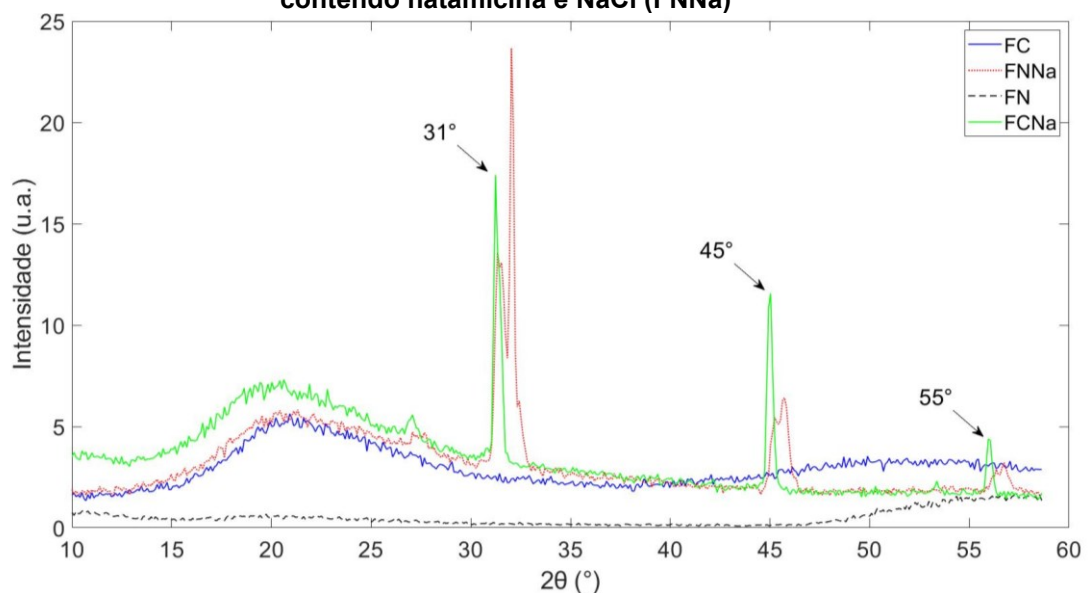
Podem ser observadas as bandas de amida secundária nas amostras FC e FCNa em 1460 cm^{-1} e 1462 cm^{-1} , como também as bandas do grupamento -OH em

3404 cm^{-1} e 3618 cm^{-1} , do grupamento-CH em 2989 cm^{-1} e 2958 cm^{-1} , e de amida primária em 1662 cm^{-1} e 1693 cm^{-1} , respectivamente.

Para os revestimentos contendo natamicina pode-se observar o aparecimento do sinal referente ao grupamento éter contido na estrutura da mesma, para FN em 1002 cm^{-1} e FNNa em 954 cm^{-1} (Figura 12). A literatura sugere que íons de sódio formam complexos de coordenação com grupamentos de álcool e éter presentes na natamicina via ligação eletrostática com a hidroxila ou envolvimento de orbitais de elétrons livres de átomos de oxigênio (MA *et al.*, 2007). Chuang *et al.* (2015) relataram este efeito de interação do sódio iônico com amido, por alterações nas bandas de éter. No presente trabalho, este efeito é evidenciado pelo deslocamento da banda do grupamento éter de 1002 cm^{-1} para 954 cm^{-1} além de uma redução da amplitude e intensidade das bandas de -OH nos filmes contendo cloreto de sódio.

A análise de DRX foi realizada nas amostras e os difratogramas estão apresentados na Figura 13. Notou-se que as amostras de filme de caseinato de sódio controle (FC) e contendo natamicina (FN) apresentaram comportamento amorfo. Já as amostras contendo o NaCl apresentaram pico relativos à cristalinidade deste composto.

Figura 13 - Difratogramas de raio-X das amostras formulação controle (FC); formulação controle adicionado de NaCl (FCNa); formulação contendo natamicina (FN) e formulação contendo natamicina e NaCl (FNNa)



Fonte: Autoria própria (2022).

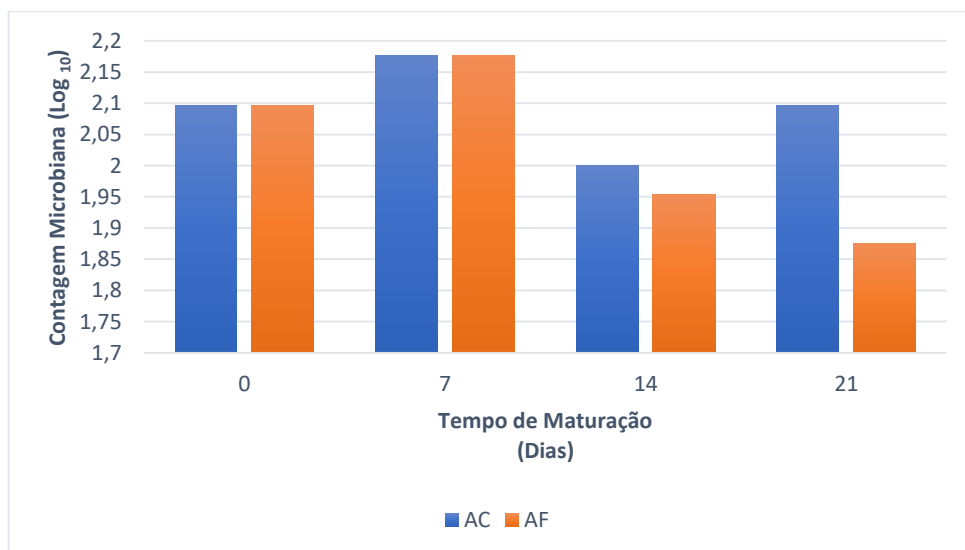
Na literatura é relatado que a natamicina apresenta vários picos diferentes na região de 10 a 30 °, o que demonstra seu estado semicristalino (LIU *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2021). Assim, pode-se concluir que o procedimento de solubilização prévia da natamicina em glicerol levou a manter a natamicina bem distribuída no material e com forma amorfa. GRAFIA *et al.*, (2018) e LUCIANO *et al.*, (2021), descreveram a presença de picos de cristalinidade da natamicina nos filmes, o que possivelmente isso se dá pela sua baixa solubilidade em água o que leva a manter sua estrutura semicristalina quando suspensa na solução filmogênica.

Os picos de cristalinidade identificados nas amostras FCNa e FNNa são relativos ao NaCl. Os picos localizados em 31, 45 e 55° também foram identificados para o NaCl por Kumar *et al.* (2012).

5.5 Aplicação da solução filmogênica nos queijos e análises durante a maturação

Os resultados das análises de contagem de bolores e leveduras no queijo minas meia cura durante o seu período de maturação contendo a solução filmogênica (AF) e a amostra controle (AC) estão na Figura 14

Figura 14 – Resultados de contagem de bolores e leveduras (Log_{10}) realizadas no queijo minas meia cura durante o seu processo de maturação na amostra controle (AC) e na amostra com a solução filmogênica (AF)



Fonte: Autoria própria (2023).

A temperatura e a umidade relativa para os dias 0, 7, 14 e 21 foram, respectivamente, 9,9°C e 78%, 9,9°C e 77%, 10,1°C e 76%, 9,8°C e 77%.

Pode ser observado que inicialmente as amostras já apresentaram contagem microbiana o que pode estar ligado à uma contaminação do meio ou na formulação da mesma. Nessa análise, vale ressaltar que foram utilizadas amostras específicas para cada período de maturação (0, 7, 14, 21 dias) mantendo as demais até o momento da retirada para realização da coleta e contagem microbiana. A amostra AF possui uma menor contagem a partir do dia 14, evidenciando a efetividade do filme em contato com a amostra após alguns dias de aplicação. Fajardo *et al.* (2010) também consideraram os biofilmes de quitosana e natamicina efetivos em contato com queijo, porém resultou em contagens de bolores e leveduras menores que o apresentado nesse trabalho. Romero *et al.* (2016), observaram uma diminuição na atividade microbiana ao aplicarem filmes de farinha de tritcale em suas amostras de queijo.

Macedo (2020), ao realizar as contagens de bolores e leveduras em suas amostras, inicialmente no dia 0, também identificou leitura, sendo de $6,8 \log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$. Porém, após nove dias de armazenamento refrigerado, ocorreu um aumento no desenvolvimento destes microrganismos, com valores que variaram entre 10,5 a $10,8 \log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, concluindo que bolores e leveduras não foram afetados pela aplicação das coberturas comestíveis de alginato de sódio no queijo de coalho.

Após o período de 21 dias, foi nítido a proliferação de bolores e leveduras nas amostras sem a presença da cobertura, conforme Figura 15.

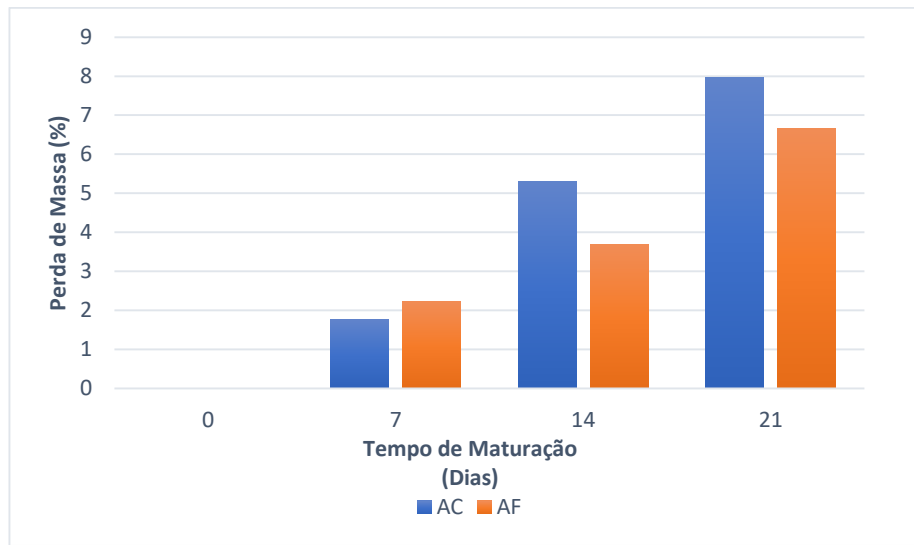
Figura 15 – Queijo minas meia cura com e sem cobertura após o período de maturação



Fonte: Autoria própria (2022).

Conforme pode ser observado na figura 16, o percentual de perda de massa para os queijos sem a presença do revestimento foi consideravelmente maior ao ser comparada com o queijo contendo a solução.

Figura 16 – Resultados de percentual de perda de massa realizadas do queijo minas meia cura durante o seu processo de maturação da amostra controle (AC) e a amostra com a solução filmogênica (AF)



Fonte: Autoria própria (2023).

Esse comportamento também foi observado por Macedo (2020), que mostraram que as coberturas comestíveis de alginato de sódio em queijo de coalho influenciaram positivamente na conservação da perda de massa, já que no mesmo ocorreu uma menor porcentagem desse parâmetro nas amostras tratadas em relação ao controle.

Oliveira *et al.* (2018) destacaram que as tecnologias de coberturas e filmes comestíveis além de suprir às necessidades básicas das embalagens convencionais podem diminuir a perda de água do alimento. As coberturas comestíveis em contato com a superfície do queijo podem formar uma espécie de barreira superficial capaz de proteger e gerar uma contenção da perda de substâncias, aumentando a vida útil do produto (CERQUEIRA *et al.*, 2009). Sendo esse o principal papel de uma cobertura comestível, atuando como uma barreira à perda de umidade, controlar trocas gasosas e evitar contaminações microbiológicas e químicas (HANSTMANN, 2017). É considerada uma barreira semipermeável à umidade e compostos aromáticos, além

de controlar toda a transferência de massa em sistemas alimentícios (LIMPAN *et al.*, 2010).

Os resultados na análise centesimal da amostra FC após o período de maturação foram umidade a $42,38 \pm 0,24$ %, cinzas $4,32 \pm 0,01$ %, proteínas $21,71 \pm 0,31$ %, lipídios $25,04 \pm 0,84$ % e carboidrato $6,55 \pm 0,86$ %. De acordo com a Instrução normativa nº 74, de 24 de julho de 2020 que dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado queijo minas meia cura, o teor de umidade pode variar de 36,0 a 45,9% e o teor de gordura no extrato seco de 42 a 59,9%. Logo, o queijo utilizado para este projeto estava em conformidade com o seu conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em porcentagem classificado como semi-gordo a gordo, e, em conformidade com o conteúdo de umidade em porcentagem, considerado um queijo de média umidade.

5.6 Análises das amostras de queijo maturado – *shelf life*

5.6.1 Cor e textura durante a vida útil

Vale ressaltar que nesta etapa de avaliação os queijos foram submetidos inicialmente ao processo de toalete, onde o filme contendo natamicina foi removido. Foram realizadas análises estatísticas entre os resultados obtidos para cada mês durante o *shelf-life* comparando a amostra maturada com a aplicação do filme de caseinato contendo natamicina junto da salmoura (AF) e a amostra tratada somente com a salmoura controle (AC), como pode ser observado na Tabela 6. As alterações para cada amostra durante o período de vida útil estão apresentados nas Figuras 17 (A) para L^* e a^* , (B) para b^* e C^* , (C) para h° e (D) para a textura (força de punção, no centro e casca do queijo).

Os valores apresentados mostram que os parâmetros de cor e textura variam ao longo do tempo de armazenamento e que existem diferenças entre as amostras AF e AC. Observando a Figura 17 (A) nota-se que as amostra AF e AC apresentaram um aumento na luminosidade (L^*) até os 90 dias e na sequência houve uma redução e estabilização. As duas amostras tiveram um aumento importante nos valores de a^* a partir dos 120 dias de armazenamento. Para os valores de b^* (Figura 17 (B)), houve uma redução aos 60 dias de armazenamento, para as duas amostras, seguido de um

aumento até os 120 dias. Por fim os valores até o fim do período de avaliação mantiveram-se semelhantes aos valores encontrados aos 120 dias. O comportamento do parâmetro Croma (C^*) teve o mesmo comportamento de b^* . Analisando a Figura 17 (C) é visível uma redução no ângulo de hue (h°) para as duas amostras ao longo do tempo de armazenamento. A tendência geral da cor pode ser notada Figura 17 (C) com o parâmetro Delta E (diferença de cor entre os tratamentos para cada tempo de avaliação).

Tabela 6 – Valores dos parâmetros de cor (L*, a*, b*, C* e h°) e textura (Força de punção no centro (F_{centro}) e Força de punção na casca do queijo (F_{casca})) durante o *shelf life* das amostras AF (tratadas com o filme durante a maturação) e AC (controle).

(continua)

Formulação	Dia 30						
	L*	a*	b*	C*	h°	F _{centro} (N)	F _{casca} (N)
AF	84,33±0,45 ^b	-1,95±0,07 ^b	25,75±0,34 ^a	25,82±0,34 ^a	94,34±0,17 ^a	3,86±0,41 ^a	5,57±0,71 ^a
AC	80,80±0,65 ^a	-2,67±0,11 ^a	27,14±0,40 ^b	27,28±0,41 ^a	95,63±0,21 ^b	5,29±0,13 ^b	7,69±0,70 ^a
Formulação	Dia 60						
	L*	a*	b*	C*	h°	F _{centro} (N)	F _{casca} (N)
AF	87,63±0,30 ^a	-2,20±0,17 ^a	22,32±0,37 ^a	22,43±0,37 ^a	96,65±0,45 ^a	2,52±0,28 ^b	3,44±0,24 ^a
AC	86,38±0,55 ^a	-2,47±0,08 ^a	23,41±0,32 ^b	23,55±0,32 ^b	96,03±0,16 ^a	2,28±0,09 ^a	3,90±0,28 ^a
Formulação	Dia 90						
	L*	a*	b*	C*	h°	F _{centro} (N)	F _{casca} (N)
AF	86,63±0,50 ^b	-1,71±0,07 ^b	23,70±0,24 ^a	23,76±0,24 ^a	94,13±0,18 ^a	2,55±0,12 ^b	2,66±0,18 ^a
AC	84,92±0,21 ^a	-2,47±0,16 ^a	25,03±0,24 ^b	25,16±0,25 ^b	95,61±0,33 ^b	2,11±0,10 ^a	3,18±0,15 ^a
Formulação	Dia 120						
	L*	a*	b*	C*	h°	F _{centro} (N)	F _{casca} (N)
AF	84,69±0,48 ^b	-2,40±0,09 ^a	25,73±0,26 ^a	25,84±0,26 ^a	95,33±0,18 ^a	2,76±0,13 ^a	2,90±0,10 ^a
AC	82,63±0,38 ^a	-2,51±0,06 ^a	26,60±0,22 ^b	26,72±0,22 ^b	95,39±0,14 ^a	2,94±0,11 ^a	2,55±0,14 ^a
Formulação	Dia 150						
	L*	a*	b*	C*	h°	F _{centro} (N)	F _{casca} (N)
AF	85,27±0,58 ^a	-1,54±0,18 ^a	23,25±0,31 ^a	23,31±0,32 ^a	93,76±0,42 ^a	3,77±0,15 ^a	3,67±0,16 ^a
AC	85,88±0,38 ^a	-1,58±0,11 ^a	24,78±0,15 ^b	24,83±0,16 ^b	93,64±0,24 ^a	3,24±0,17 ^a	3,29±0,16 ^a

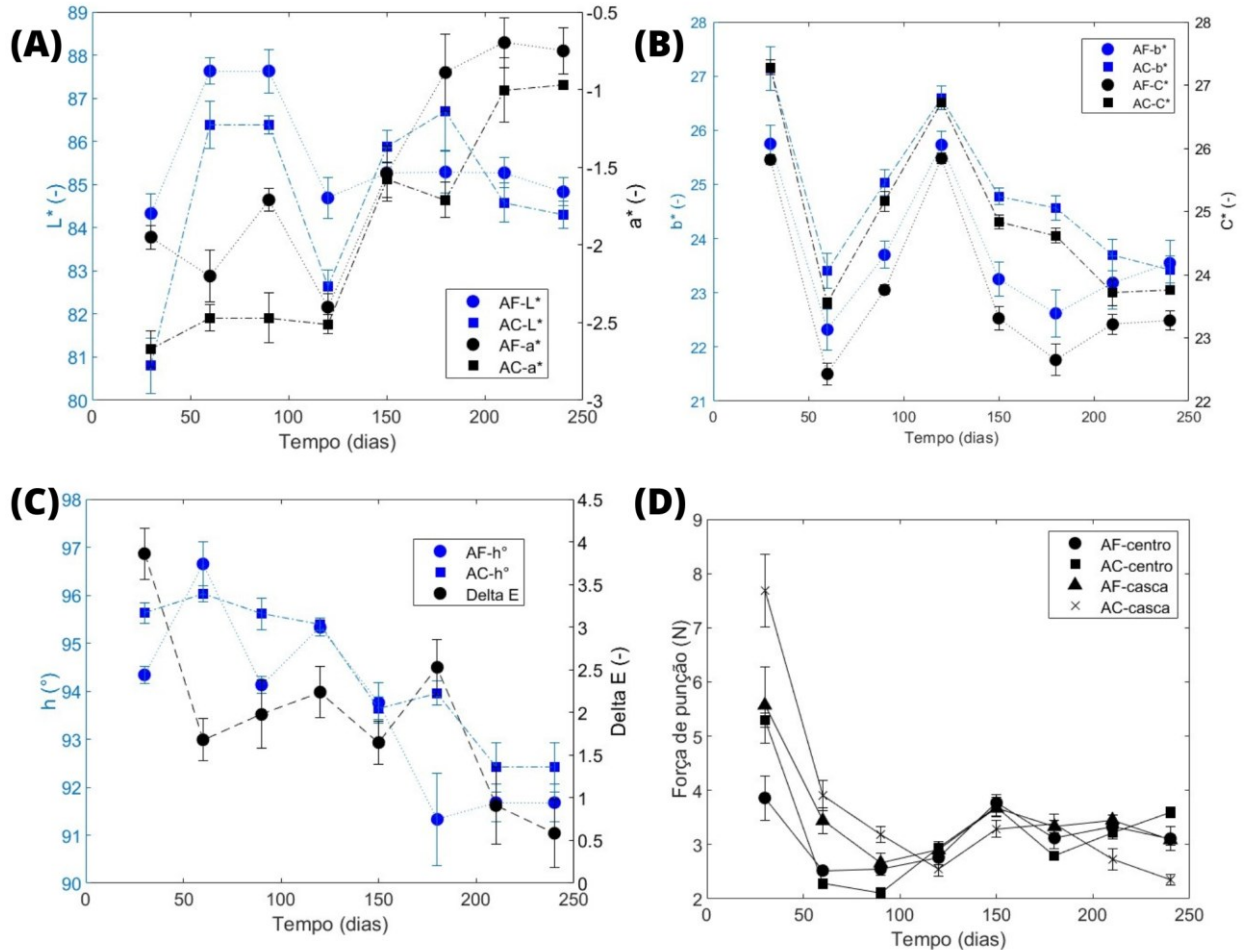
Tabela 6 – Valores dos parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* , C^* e h°) e textura (Força de punção no centro (F_{centro}) e Força de punção na casca do queijo (F_{casca})) durante o *shelf life* das amostras AF (tratadas com o filme durante a maturação) e AC (controle). (conclusão)

		Dia 180					
Formulação	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	F_{centro} (N)	F_{casca} (N)
AF	85,29±0,49 ^a	-0,89±0,25 ^b	22,62±0,43 ^a	22,65±0,43 ^a	91,33±0,96 ^a	3,12±0,20 ^a	3,33±0,12 ^a
AC	86,69±0,90 ^a	-1,71±0,11 ^a	24,56±0,23 ^b	24,62±0,23 ^b	93,96±0,25 ^b	2,79±0,06 ^a	3,38±0,19 ^a
		Dia 210					
Formulação	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	F_{centro} (N)	F_{casca} (N)
AF	85,27±0,36 ^a	-0,70±0,16 ^a	23,18±0,49 ^a	23,21±0,49 ^a	91,68±0,39 ^a	3,32±0,22 ^a	3,45±0,11 ^b
AC	84,58±0,45 ^a	-1,00±0,21 ^a	23,69±0,29 ^a	23,72±0,29 ^a	92,41±0,52 ^a	3,21±0,19 ^a	2,73±0,14 ^a
		Dia 240					
Formulação	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	F_{centro} (N)	F_{casca} (N)
AF	84,83±0,33 ^a	-0,75±0,15 ^a	23,54±0,42 ^a	23,27±0,45 ^a	91,67±0,39 ^a	3,11±0,22 ^a	3,09±0,02 ^b
AC	84,30±0,32 ^a	-0,97±0,19 ^a	23,42±0,25 ^a	23,75±0,28 ^a	92,41±0,52 ^a	3,59±0,17 ^a	2,35±0,15 ^a

Médias ± desvios padrão das amostras em triplicata; ^{a,b,c}letras sobrescritas diferentes nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (entre tratamentos para o mesmo período de tempo).

Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 17 – Parâmetro de cor e textura avaliados ao longo dos 240 dias de armazenamento do queijo minas meia cura: (A) L^* e a^* ; (b) b^* e C^* ; (C) h° e Delta E (diferença entre os tratamentos para cada intervalo de tempo) e (D) Força de punção determinadas no centro do queijo e na casca. AF – amostras tratadas com o filme contendo natamicina junto à salmoura, e AC- controle (somente salmoura)



Fonte: Autoria própria (2023).

A coloração dos tratamentos apresentaram maior diferença entre si no início do período de armazenamento, como se observa pelos valores de Delta E (Figura 17 (C)) que foram sendo reduzidos ao longo do tempo de armazenamento. Todas essas modificações na cor podem ser associadas ao fenômeno chamado “oil dropping”, que resulta em uma migração da gordura para a superfície do queijo, levando a um amarelamento da amostra (aumento do parâmetro b^*). De acordo com Romani *et al.* (2002) observaram este fenômeno em amostras de queijo Parmigiano Reggiano armazenados durante três meses em embalagens com atmosfera modificada.

Quanto à textura, os dois tratamentos (AC e AF) tiveram até 60 dias de armazenamento valores de força de punção maiores para a casca externa do que em

seu centro. Ainda, a amostra tratada somente com salmoura apresentou maior dureza tanto da casca quanto do centro quando comparada à amostra que foi maturada com o filme contendo a natamicina. Este resultado está associado à perda de massa durante a maturação (Figura 16), uma vez que a amostra revestida com o filme durante a maturação reteve maior quantidade de água, levando a uma menor dureza. Contudo, após 60 dias de armazenamento as duas amostras apresentaram comportamento semelhante de dureza para a casca e o centro. Este comportamento pode ser explicado pela migração da umidade do centro para a casca, reduzindo a dureza da mesma e mantendo o equilíbrio dentro de toda a amostra.

Esses resultados indicam que apesar da utilização do filme de caseinato de sódio contendo natamicina, durante a maturação, poder inicialmente influenciar nas características do queijo ao longo do tempo de armazenamento, a tendência é de igualdade ao tratamento controle até o fim da vida útil.

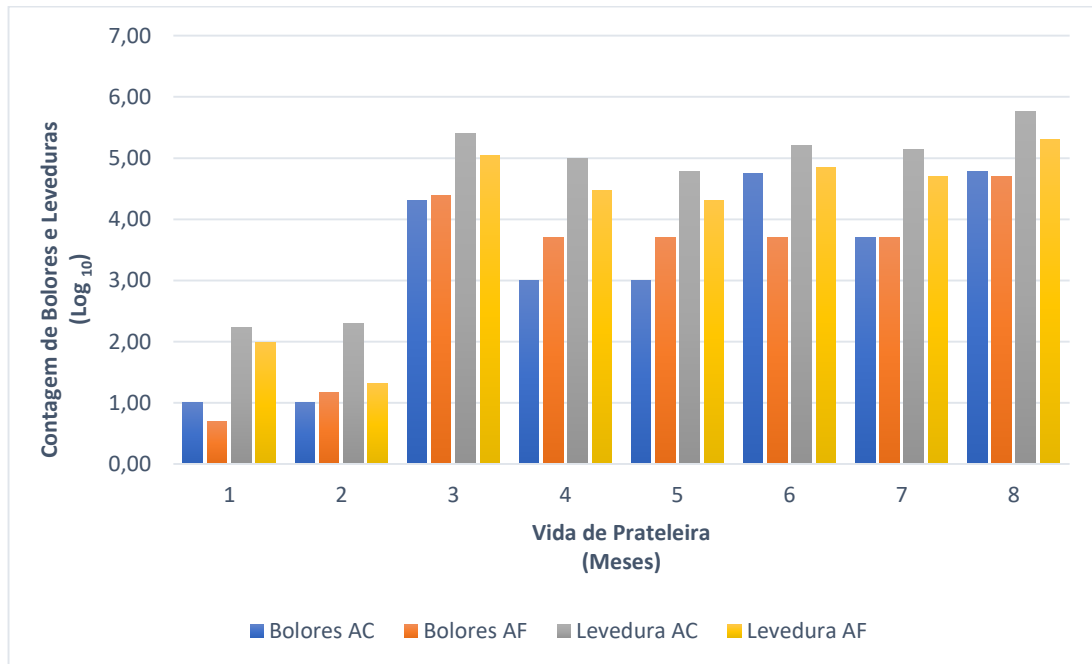
São encontrados na literatura trabalhos que descrevem a vida de prateleira de queijos tratados com recobrimentos comestíveis. Como o trabalho desenvolvido por Berti *et al.* (2019), que avaliaram o efeito do recobrimento de amido contendo natamicina e nisina durante a maturação de queijo Gouda. Os parâmetros de cor e textura foram avaliados somente durante o período de maturação. Os mesmos observaram que não houve alteração de cor nem de outras propriedades físico-químicas (pH, cinzas, proteínas, cloretos, atividade de água, índice de maturação). No entanto, o queijo coberto apresentou diferença na textura, se tornando mais rígido. Diferente deste trabalho que não ocorreu diferenças significativas dos parâmetros de cor e textura.

Vale salientar a principal diferença da situação avaliada no presente trabalho, em que o filme foi aplicado durante a maturação e então removido para análise de vida de prateleira. Este procedimento se faz necessário para garantir que a concentração de natamicina esteja abaixo do permitido na legislação brasileira (limite máximo de 1 mg/dm² ou 5 mg/kg na superfície, e não deve ser detectado em profundidades de 2 mm e deve estar ausente dentro da massa de queijo) (BRASIL, 1996).

5.6.2 Contagem microbiológica

As contagens das colônias de bolores e leveduras durante os 8 meses de vida de prateleira do queijo minas meia cura estão apresentados na Figura 18.

Figura 18- Contagem de bolores e leveduras durante o tempo de vida de prateleira para as amostras maturadas com a cobertura (AF) e sem a cobertura (AC)



Fonte: Autoria própria (2023).

Como pode ser observado, a contagem durante todos os meses apresentou menor contagem para o queijo envolvido pela cobertura contendo o antifúngico. Porém, apresentaram contagem progressiva para resultados de leveduras para ambas amostras.

O termo *shelf life* está intimamente relacionado com a manutenção da qualidade do alimento durante o período de estocagem e pode ser definido como o tempo em que o mesmo é conservado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa e luz, ocorrendo pequenas alterações consideradas aceitáveis pelo fabricante, pelo consumidor e pela legislação alimentar vigente (GIMÉNEZ; ARES; ARES, 2012).

A Portaria nº 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) contém Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos

Produtos Lácteos. Esta norma apresenta, entre outros parâmetros a serem observados, os padrões microbiológicos para os queijos divididos em categorias.

Na Instrução Normativa nº 74, de 24 de julho de 2020 do Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa), dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado queijo minas meia cura, é colocado que este deverá obedecer aos critérios determinados para queijo de média umidade do Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos da Portaria nº 146, ou seja, não há limites para bolores e leveduras.

A superfície dos queijos é mais propensa a ser contaminada por microrganismos devido às suas condições de acidez adequadas e alta atividade de água (PROULX *et al.*, 2017). Problemas causados pela contaminação microbiana durante a vida útil de queijos engloba grande parte das pesquisas, resultado também, de ausência de barreira efetiva das embalagens utilizadas que pode causar perda de umidade, dureza e alteração de propriedades organolépticas (MEI *et al.*, 2020).

A perda de água depende da permeabilidade ao vapor de água do material de embalagem, portanto, o uso de embalagens ideais ajuda a diminuir a transferência de oxigênio e a perda de umidade, protege-o contra microrganismos e mantém a aparência, textura e propriedades sensoriais do queijo (JAFARZADEH *et al.*, 2021). Os materiais de revestimento e película devem ser escolhidos com base no tipo de queijo (fresco, teor de umidade ou maturado) e nas condições de armazenamento (umidade relativa e temperatura) (Martins *et al.*, 2012). A embalagem ideal para queijo tem barreira à umidade que controla a taxa de perda de água e impermeabilidade ao oxigênio e UV, minimizando a atividade de bactérias e fungos, e simultaneamente leva a boas propriedades de textura e sensorial do queijo (PANTALEAO *et al.*, 2007).

Ferrão *et al.* (2016), alegam que queijos em sua totalidade estão bioquimicamente na categoria de alimentos instáveis, expostos a diferentes deteriorações microbianas e químicas durante a fabricação, processamento e armazenamento. Porém, para queijos classificados como duros e maturados, conforme o queijo minas meia cura o qual é classificado como queijo de massa semidura, bactérias internas encontram certa dificuldade em crescer devido à taxa de maturação gradual pelo seu alto teor de sal e baixa umidade, consoante Jafarzadeh *et al.* (2019).

Coberturas e embalagens comestíveis podem ser preparadas a partir de diversas fontes biológicas para preservar o queijo, porém, o material utilizado pode interferir ou melhorar o desempenho dos filmes e de suas principais características, como propriedades de barreira, microbianas, mecânicas e ópticas (AHMAD *et al.*, 2016). Os requisitos para escolha dos materiais da embalagem seguem de acordo com o tipo de queijo, pois as taxas de maturação, estabilidade mecânica e teor de água irão depender de sua composição.

Assim, os materiais de revestimento e filmes devem ser escolhidos de acordo com as características do queijo, como teor de umidade, fresco ou maturado, e condições de armazenamento, como umidade relativa e temperatura. Pela IN nº 74, de 24 de julho de 2020, o queijo minas meia cura pode ser acondicionado em embalagens plásticas, com ou sem vácuo, podendo ter revestimentos próprios aprovados em regulamentos técnicos específicos.

Cerqueira *et al.* (2010) relataram um tipo de queijo semiduro regional revestido com quitosana e galactomanana extraído de sementes de *Gleditsia triacanthos* e armazenado em diferentes temperaturas. Ocorreu um aumento das bactérias do ácido láctico e uma diminuição no crescimento de fungos após 120 dias de maturação para o queijo revestido. Bonilla e Sobral (2019) produziram filmes comestíveis de mistura de gelatina-quitosana contendo extrato de boldo, aplicados em fatias de queijo prato, ocorrendo diminuição na oxidação e crescimento microbiano.

Já Youssef *et al.* (2019) afirmaram que o revestimento de queijo com materiais bio-nanocompósitos contendo quitosana/álcool polivinílico diminuíram consideravelmente a contagem de leveduras, estreptococos, bolores e coliformes durante o armazenamento, bem como impediu o crescimento de fungos na superfície do queijo.

Os mecanismos pelos quais tais revestimentos melhoram a vida útil dos produtos de queijo não dependem apenas de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, mas também de algumas propriedades de barreira que defendem contra fatores ambientais deteriorantes (JAFARZADEH *et al.*, 2021). Logo, no presente trabalho ambas as amostras, após seu tempo de maturação de 21 dias, permaneceram 8 meses de tempo de vida útil em suas embalagens convencionais já utilizadas comercialmente para esse tipo de queijo, sendo as embalagens a vácuo de multicamadas termo encolhível. A mesma não sendo de alta barreira, poderia permitir, de certo modo, a transferência do meio externo para o produto, o que possibilitaria o

desenvolvimento de microrganismos uma vez que o queijo já apresentasse contagem inicial.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o isolado fúngico do queijo pertence ao gênero *Penicillium* pelas suas características macro e micromorfológicas. A natamicina apresentou CIM de 128 µg/mL para este isolado. O filme com natamicina foi preparado com sucesso, tanto na presença quanto na ausência de NaCl. A presença da salmoura causou redução na resistência mecânica do filme, bem como aumento de solubilidade e permeação ao vapor d'água, sendo característico da presença de NaCl e não da natamicina. Ainda, por FTIR identificou-se a formação de complexos de coordenação entre os íons de sódio com grupamentos de álcool e éter e por DRX a estrutura amorfa dos filmes, mesmo na presença de natamicina, o que indica sua solubilização na matriz filmogênica. As amostras de queijos contendo a solução filmogênica apresentaram menor percentual de perda de massa e menor contagem de bolores e leveduras, evidenciando que a aplicação da solução é viável, uma vez que atua como uma barreira superficial para perda de umidade e proliferação de fungos. Isso, sem alterar visivelmente a coloração das amostras em comparação ao padrão, sendo vantajoso comercialmente. A verificação de coloração e textura durante a vida de prateleira das amostras com e sem a solução filmogênica, evidenciou que ao longo do tempo de armazenamento, a tendência é de semelhança ao tratamento controle. Já a contagem microbiológica de bolores e leveduras, durante todos os meses apresentou menor contagem para o queijo envolvido pela cobertura contendo o antifúngico. Porém, ambas as amostras apresentaram resultados crescentes para resultados de leveduras. Logo, pode-se concluir que a aplicação de revestimento comestível de caseinato de sódio contendo natamicina, para o controle de proliferação de bolores e leveduras em queijo minas meia cura durante seu período de maturação obtiveram resultados satisfatórios em seus parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

- ABIQ. Associação brasileira das indústrias de queijos. **Demanda firme segue sustentando os preços do lácteos, 2020**. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2266&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6. Acesso em: 29 nov. 2020.
- ABIQ. Associação brasileira das indústrias de queijos. **Indústria de queijos: como continuar crescendo? Associados participam da 12ª edição do Fórum MilkPoint Mercado, 2022**. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2448&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=29. Acesso em: 10 jan. 2023.
- ABIQ. Associação brasileira das indústrias de queijos. **Produção de leite no Brasil deve crescer em 2023**. Disponível em: https://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=2519&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6. Acesso em: 10 jan. 2023.
- AHMAD, M. *et al.* Characterisation of composite films fabricated from collagen/chitosan and collagen/soy protein isolate for food packaging applications. **Rsc Advances**, v. 6, n. 85, p. 82191-82204, ago. 2016. DOI: 10.1039/c6ra13043g. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84984820261&origin=inward&txGid=c6f8bcd89d59e96af6a37233725cb018>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- APARICIO, J. F. *et al.* Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 61-78, out. 2016. DOI: 10.1007/s00253-015-7077-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-015-7077-0>. Acesso em: 30 jul. 2022.
- ARIMA, A. A. *et al.* The negligible effects of the antifungal natamycin on cholesterol-dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers may explain its low oral and topical

toxicity for mammals. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 1, n. 122, p. 202-208, out. 2014. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.06.058. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25048356/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ARORA, A.; PADUA, G. W. Nanocomposites in food packaging. **Journal of Food science**, v. 75, n. 1, p. 43-49, jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01456.x>. Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2009.01456.x>. Acesso em: 30 jul. 2022.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, v. 76, p. 1-12, jun. 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.01.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713517300014>. Acesso em: 30 jul. 2022.

BALAGUER, M. P. *et al.* Functional properties and antifungal activity of films based on gliadins containing cinnamaldehyde and natamycin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 62-71, maio. 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160513005801>. Acesso em: 30 jul. 2022.

BALDINO, L.; CARDEA, S.; REVERCHON, E. Biodegradable membranes loaded with curcumin to be used as engineered independent devices in active packaging. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 518-526, fev. 2017. DOI: 10.1016/j.jtice.2016.12.020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1876107016305302>. Acesso em: 30 jul. 2022.

BERTI, S. *et al.* Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. **Food Bioscience**, v. 31, p. 100447, out. 2019. DOI: 10.1016/j.fbio.2019.100447. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429218302025>. Acesso em: 30 jul. 2022.

BÍBLIA. **Bíblia sagrada**. Almeida corrigida, revisada e fiel. São Paulo: Sociedade Bíblica Trinitariana do Brasil, 2011.

BONILLA, J.; SOBRAL, P. J. Gelatin-chitosan edible film activated with Boldo extract for improving microbiological and antioxidant stability of sliced Prato cheese. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 5, p. 1617-1624, nov. 2019. DOI: 10.1111/ijfs.14032. Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85056909918&origin=inward&txGid=2841f21404ab89a5546b03679b8a9e63>. Acesso em: 18 jan. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 74, de 24 de julho de 2020**, Dispõe sobre a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o produto denominado queijo minas meia cura. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de jul. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-74-de-24-de-julho-de-2020-269156370>. Acesso em 07 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005**. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalados. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 nov. 2005. Disponível em: https://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-22_2005.pdf. Acesso em 07 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade

dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 mar. 1996. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>. Acesso em 07 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria nº **540, de 27 outubro de 1997**. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. Brasília, 27 out. 1997. Disponível em: https://www.alimentosonline.com.br/index.php?action=vqfrNqZNVXbpyq8rPMKcaM21qYwLVA&artigo_id=805&sumario=1. Acesso em 07 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº **12, de 2 janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, 12 jan. 2001. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33916/0/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+12%2C+de+02+de+janeiro+de+2001/0fa7518b-92ff-4616-85e9-bf48a6a82b48?version=1.0>. Acesso em 07 fev. 2023.

BRODOWSKA, A. J.; NOWAK, A.; SMIGIELSKI K. Ozone in the food industry: Principles of ozone treatment, mechanisms of action, and applications: An overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 58, n. 13, p. 2176-2201, jul. 2018. DOI: 10.1080/10408398.2017.1308313. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28394634/>. Acesso em 07 fev. 2023.

CERQUEIRA, M. A. *et al.* Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films - A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 175-184, maio. 2012. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.07.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X11002086>. Acesso em: 30 jul. 2022.

CERQUEIRA, M. A. *et al.* Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1456–1462, jan. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf802726d>. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/23949644_Functional_Polysaccharides_as_Edible_Coatings_for_Cheese. Acesso em: 07 fev. 2023.

CERQUEIRA, M. A. *et al.* Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 97, n. 1, p. 87-94, maio. 2010. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.019>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877409004828?via%3Dihub>. Acesso em: 18 jan. 2023.

CHUANG, L. *et al.* Effect of sodium chloride on the glass transition of condensed starch systems. **Food Chemistry**, v. 184, p. 65-71, out. 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.031>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814615003945>. Acesso em: 07 fev. 2023.

COSTA, M. J. *et al.* Use of edible films and coatings in cheese preservation:

Opportunities and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 84-92, maio. 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.02.013. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918301066>. Acesso em: 30 jul. 2022.

DA SILVA, T. B. V. *et al.* Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. **Food and Function**, v. 10, n. 12, p. 7697-7706, out. 2019. DOI: 10.1039/c9fo01315f. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31720644/>. Acesso em: 31 jul. 2022.

DALHOFF, A. A. H.; LEVY, S. B. Does use of the polyene natamycin as a food preservative jeopardise the clinical efficacy of amphotericin B? A word of concern.

International Journal of Antimicrobial Agents. v.45, p. 564-567, maio. 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857915001028>. Acesso em: 31 jul. 2022.

DELVES-BROUGHTON, J. *et al.* Natamycin. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. (org.). **Antimicrobials in food**. 3. ed. New York, 2005.

DROBY, S. *et al.* Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire.

Postharvest Biol. Technol. v. 27, n. 2, p. 127-135, fev. 2003. DOI:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00046-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00046-7). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521402000467>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ELSAYED, E. A.; FARID, M.A.; EL-ENSHASY, H. A. Enhanced Natamycin production by *Streptomyces natalensis* in shake-flasks and stirred tank bioreactor under batch and fedbatch conditions. **BMC Biotechnol**, n. 19, v. 46, out. 2019.

<https://doi.org/10.1186/s12896-019-0546-2>. Disponível em:

<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-019-0546-2>.

Acesso em: 10 fev. 2023.

FAJARDO, P. *et al.* Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n.

4, p. 349–356, dez. 2010. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877410003547>. Acesso em: 31 jul. 2022.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe: Rome**, 2014.

Disponível em: <https://www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/239394/007>. Acesso em: 10 jan. 2023.

FERNANDEZ, B. *et al.* Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. **Food Control**, v. 78, p. 350-356, ago. 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.03.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.007>. Acesso em: 4 jul. 2022.

FERRÃO, L. L. *et al.* Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. **Food Research International**, v. 86, p. 93-102, ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.034>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916301806>. Acesso em: 18 jan. 2023.

FERYSIUK, K.; WÓJCIAK, K. M. Redução de nitrito em produtos cárneos através da aplicação de vários ingredientes à base de plantas. **Antioxidantes**. v. 9, n. 8, p. 711, ago. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9080711>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/8/711>. Acesso em: 6 jul. 2022.

GARNIER, L. *et al.* Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 191-197, jan. 2017. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27794247/>. Acesso em: 4 jul. 2022.

GIMÉNEZ, A.; ARES, F.; ARES, G. Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. **Food research international**, v. 49, n. 1, p. 311-325, nov. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912002517>. Acesso em: 18 jan. 2023.

GLASS, K.; MU, M.; LEVINE, B.; ROSSI, F. Inibição de *Clostridium botulinum* em queijos preparados pasteurizados com teor reduzido de sódio. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 9, p. 1478-1488, set. 2017. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-17-027. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22095308>. Acesso em: 4 jul. 2022.

GONZÁLEZ-FORTE, L. S.; AMALVY, J. I.; BERTOLA, N. Corn starch-based coating enriched with natamycin as an active compound to control mold contamination on semi-hard cheese during ripening. **Heliyon**, v. 5, n. 6, jun. 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01957. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01957>. Acesso em: 4 jul. 2022.

GRAFIA, A. L. *et al.* Development of an antifungal film by polyethylene surface modification with natamycin. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 18, p. 191-200, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.001> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214289418300218?via%3Di> hub. Acesso em: 7 jul. 2022.

GUPTA, V. G.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (org.). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Penicillium system properties and applications. Cambridge: **Elsevier**, 2018. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2014-0-00305-X>. Acesso em: 10 fev. 2023.

HA, N. S.; LU, G. A review of recent research on bio-inspired structures and materials for energy absorption applications. **Composites Part B: Engineering**, v. 181, p. 107, jan. 2020. Disponível em: Acesso em: 6 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107496>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359836819339964>. Acesso em: 7 jul. 2022.

HANSMANN, P. E. **Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água de filmes de quitosana secos em condições de ar controladas utilizando bomba de calor**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017. Disponível em:

<https://sistemas.furg.br/sistemas/sab/arquivos/bdtd/0000012158.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2023.

HE, C. *et al.* Effect of natamycin on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*— Postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 151, p. 134-141, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.02.009>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521418309116>. Acesso em: 6 jul. 2022.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasília, DF, 2019. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 29 nov. 2020.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 142-148, abr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166909000287>. Acesso em: 7 jul. 2022.

JAFARZADEH, S. *et al.* Application of antimicrobial active packaging film made of semolina flour, nano zinc oxide and nano-kaolin to maintain the quality of low-moisture mozzarella cheese during low-temperature storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 6, p. 2716-2725, out. 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1002/jsfa.9439>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.9439>. Acesso em: 18 jan. 2023.

JAFARZADEH, S. *et al.* Cheese packaging by edible coatings and biodegradable nanocomposites; improvement in shelf life, physicochemical and sensory properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 218-231, out. 2021. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.021>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224421004593>. Acesso em: 18 jan. 2023.

JERMANN, C. *et al.* Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 31, p. 14-27, out. 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.007>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856415001162>. Acesso em: 18 jan. 2023.

KALLINTERI, L. D.; KOSTOULA, O. K.; SAVVAIDIS, I. N. Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the *shelf-life* of Galotyri cheese. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 176-181, dez. 2013. DOI: 10.1016/j.fm.2013.05.006. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.006>. Acesso em: 7 jul. 2022.

KATO, M.; WICKNER, W. Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. **European Molecular Biology**

Organization Journal, v. 20, n. 15, p. 4035–4040, ago. 2001. DOI:

10.1093/emboj/20.15.4035. Disponível em:

<https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/20.15.4035>. Acesso em: 10 fev. 2023.

KUMAR, K. K. *et al.* Electrical conduction mechanism in NaCl complexed PEO/PVP polymer blend electrolytes. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 358, n. 23, p.

3205-3211, dez. 2012. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2012.08.022 Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/256773079_Electrical_conduction_mechanism_in_NaCl_complexed_PEO/PVP_polymer_blend_electrolytes. Acesso em: 7 jul. 2022.

LACAZ, C. S. *et al.* **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, v.

44, n. 5, out. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000500013>.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/pCcJPgQ8qDnPgjxZmBgMyjt/?lang=fr#>. Acesso em: 10 fev. 2023.

LANTANO, C. *et al.* Natamycin based sol-gel antimicrobial coatings on polylactic acid films for food packaging. **Food Chemistry**, v. 165, p. 342-347, maio. 2014. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.066. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25038685/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

LI, Q. *et al.* O-Vanilina, um agente antifúngico promissor, inibe o *Aspergillus flavus* ao interromper a integridade das paredes e membranas celulares. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 5147–5158, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11371-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11371-2>. Acesso em: 30 jun. 2022.

LI, Z. *et al.* Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 7, p 1039-1045, maio. 2017. DOI: 10.1002/ptr.5823. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28524381/>. Acesso em: 30 jun. 2022.

LIMPAN, N. *et al.* Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n.1, p.85–92, set. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.031>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/223300190_Properties_of_biodegradable_blend_films_based_on_fish_myofibrillar_protein_and_polyvinyl_alcohol_as_influenced_by_blend_composition_and_pH_level. Acesso em: 07 fev. 2023.

LIU, Q. *et al.* Influence of natamycin loading on the performance of transglutaminase-induced crosslinked gelatin composite films. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 7, p. 2425-2436, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14157>. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ijfs.14157>. Acesso em: 4 jul. 2022.

LUCIANO, C. G. *et al.* Bi-layer gelatin active films with “Pitanga” leaf hydroethanolic extract and/or natamycin in the second layer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 42, p. 51246, jun. 2021. DOI: 10.1002/app.51246. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/352253276_Bilayer_gelatin_active_films_with_Pitanga_leaf_hydroethanolic_extract_andor_natamycin_in_the_second_layer. Acesso em: 4 jul. 2022.

LUTZ, A. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

LUZ, C. *et al.* Antifungal and antimycotoxigenic activity of hydrolyzed goat whey on *Penicillium* spp: An application as biopreservation agent in pita bread. **LWT**, v. 118, p. 108717, jan. 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108717. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/336385254_Antifungal_and_antimycotoxigenic_activity_of_hydrolyzed_goat_whey_on_Penicillium_spp_An_application_as_biopreservers_for_food_packaging. Acesso em: 7 jul. 2022.

MA, X. *et al.* The effects of different plasticizers on the properties of thermoplastic starch as solid polymer electrolytes. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 292, n. 4, p. 503–510, abr. 2007. DOI: 10.1002/mame.200600445. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mame.200600445> Acesso em: 4 jul. 2022.

MACEDO, R. C. B. S. **Caracterização de filmes à base de alginato de sódio e cloreto de cálcio e sua utilização na composição de coberturas comestíveis de queijo coalho**. 2020. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade, Mossoró, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/6852>. Acesso em: 07 fev. 2023.

MARQUES, K. H. S. R. *et al.* Influência do tratamento térmico no rendimento e composição físico-química de queijos frescos. **Brazilian Journal of Development**,

v. 6, n. 4, p. 19446-19460, abr. 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n6-088. Disponível em: https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/download/11097/9304?__cf_chl_tk=EQDyo6XUecl8u7rbleQatOuw3YuqlwR9alxhJjjchow-1674067449-0-gaNycGzNCNE. Acesso em: 18 jan. 2023.

MARTINEZ-RIOS, V. *et al.* Antimicrobial effect of nisin in processed cheese - Quantification of residual nisin by LC-MS/MS and development of new growth and growth boundary model for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 108952, jan. 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108952. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160520304463>. Acesso em: 4 jul. 2022.

MARTINS, J. T.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 220-227, maio. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X11002025>. Acesso em: 18 jan. 2023.

MEDEIROS, B. G. *et al.* Physical characterisation of an alginate/lysozyme nano-laminate coating and its evaluation on 'Coalho'cheese shelf life. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1088-1098, abr. 2014. DOI: 10.1007/s11947-013-1097-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-013-1097-5>. Acesso em: 4 jul. 2022.

MEENA, M. *et al.* Natamycin: a natural preservative for food applications-a review. **Food Science Biotechnology**, v. 30, n. 12, p.1481-1496, out. 2021. DOI: 10.1007/s10068-021-00981-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34868698>. Acesso em: 10 fev. 2023.

MEI, J. *et al.* Evaluation of chitosan-starch-based edible coating to improve the shelf life of bod ljong cheese. **Journal of food protection**, v. 78, n. 7, p. 1327-1334, jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-402>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X23055217>. Acesso em: 18 jan. 2023.

MESSINI, A. *et al.* Effect of chestnut tannin extract (*Castanea sativa* Miller) on the proliferation of *Cladosporium cladosporioides* on sheep cheese rind during the ripening. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 6-12, mar. 2017. DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.05.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.10.012>. Acesso em: 18 jan. 2023.

MIR, S. A. *et al.* Effect of plant extracts on the techno-functional properties of biodegradable packaging films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 141-154, out. 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.08.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417305241>. Acesso em: 5 jul. 2022.

MO, X. *et al.* Development of antifungal gelatin-based nanocomposite films functionalized with natamycin-loaded zein/casein nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106506, abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106506>: Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268005X20328800?via%3Di> hub. Acesso em: 4 jul. 2022.

MOATSOU, G. *et al.* Effect of natamycin-containing coating on the evolution of biochemical and microbiological parameters during the ripening and storage of ovine hard-Gruyère-type cheese. **International Dairy Journal**, v. 50, p. 1-8, nov. 2015. DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.05.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.010>. Acesso em: 4 jul. 2022.

MONTEL, M. C. *et al.* Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 136-154, maio. 2014. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>. Acesso em: 4 jul. 2022.

NOTTAGH, S. *et al.* Effectiveness of edible coating based on chitosan and Natamycin on biological, physico-chemical and organoleptic attributes of Iranian ultra-filtrated cheese. **Biologia**, v. 75, n. 4, p. 605-611, nov. 2020. DOI: 10.2478/s11756-019-00378-w. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2478/s11756-019-00378-w>. Acesso em: 4 jul. 2022.

OLIVEIRA, E. N. A. *et al.* Caracterização de queijos artesanais comercializados em municípios do Ceará. **E-xacta**, v. 11, n. 2, p. 55-62, out. 2018. DOI: 10.18674/exacta.v11i2.2493. Disponível em: <https://revistas.unibh.br/dcet/article/view/2493>. Acesso em: 07 fev. 2023.

OLLÉ RESA, C. P.; GERSCHENSON, L. N.; JAGUS, R. J. Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. **Food Control**, v. 44, p. 146-151, mar. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.054>. Disponível em: http://ssu.ac.ir/cms/fileadmin/user_upload/Mtahghighat/tfood/asil-article/g-p/Natamycin-and-nisin-supported-on-starch-edible-films-for-controlling-mixed-culture-growth-on-model-systems-and-Port-Salut-cheese_2014_Food-Control.pdf Acesso em: 4 jul. 2022.

PANDISELVAM, R. *et al.* Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. **Ozone: Science & Engineering**, v. 41, n.1, p. 17-34, jul. 2019. DOI: 10.1080/01919512.2018.1490636 Disponível em: <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080%2F01919512.2018.1490636>. Acesso em: 18 jan. 2023.

PANTALEAO, I.; PINTADO, M. M. E.; POÇAS, M. F. F. Evaluation of two packaging systems for regional cheese. **Food Chemistry**, v.102, n. 2, p. 481-487, maio. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.058>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606004407>. Acesso em: 18 jan. 2023.

PINTADO, C. M. B. S.; FERREIRA, M. A. S. S.; SOUSA, I. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 240-246, mar. 2010. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.05.017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671350900173X>. Acesso em: 4 jul. 2022.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997.

PROULX, J. *et al.* Pulsed light and antimicrobial combination treatments for surface decontamination of cheese: Favorable and antagonistic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1664-1673, mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11582>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030217300401>. Acesso em: 18 jan. 2023.

PURKAIT, S. *et al.* Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 6, p. 1439-1448, mar. 2020. DOI: 10.1007/s00203-020-01858-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32185411/>. Acesso em: 4 jul. 2022.

RAMOS, O. L. *et al.* Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6282-6292, nov. 2012. DOI: 10.3168/jds.2012-5478. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5478>. Acesso em: 6 jul. 2022.

ROMANI, S. *et al.* Physical, chemical, textural and sensorial changes of portioned Parmigiano Reggiano cheese packed under different conditions. **Food science and technology international**, v. 8, n. 4, p. 203-211, ago. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1106/108201302028118>. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1106/108201302028118?casa_token=ZaiVdQq6gv8AAAAA:25BS1kTh4zyc8PhxSjRblywrlOfHgm4zKaxM-DiWeqezR4pZw5J1zXsmhI-PvC9IYIMqoay9XiSx. Acesso em: 23 fev. 2023.

ROMERO, V. *et al.* Biodegradable films obtained from triticale (x Triticosecale Wittmack) flour activated with natamycin for cheese packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 10, p. 54-59, dez. 2016. DOI: 10.1016/j.fpsl.2016.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.09.003>. Acesso em: 6 jul. 2022.

SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (org.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. Washington: American Public Health Association, 2015. *E-book*. Disponível em: <https://ajph.aphapublications.org/doi/abs/10.2105/MBEF.0222>. Acesso em: 30 jul. 2022.

SÄNGERLAUB, S. *et al.* Functional properties of foamed and/or stretched polypropylene-films containing sodium chloride particles for humidity regulation. **Polymer Testing**, v. 65, p. 339-351, fev. 2018. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2017.12.002. Disponível em: <https://ur.booksc.me/book/67611481/442546>. Acesso em: 6 jul. 2022.

SHEN, C. *et al.* Application of solution blow spinning to rapidly fabricate natamycin-loaded gelatin/zein/polyurethane antimicrobial nanofibers for food packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 29, p. 100721, set. 2021. DOI: 10.1016/j.fpsl.2021.100721. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/353613844_Application_of_solution_blow_spinning_to_rapidly_fabricate_natamycin-loaded_gelatinzeinpolyurethane_Antimicrobial_nanofib. Acesso em: 4 jul. 2022.

SIVANASVARAN, S. N. *et al.* Addition of Glycerol and Sodium Chloride into Garcinia Atroviridis Chitosan film, and its application for wrapping of chicken meat. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 399-414, jun. 2021. Disponível em: https://mjas.analis.com.my/mjas/v25_n3/pdf/Sivanasvaran_25_3_4.pdf Acesso em: 6 jul. 2022.

SOBRAL, D. *et al.* Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v72i2.600pdf>. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/600>. Acesso em: 10 jan. 2023.

TE WELSCHER, Y. M. *et al.* Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. **Journal of Biological Chemistry**. v. 283 n.10, p. 6393–6401, mar. 2008. Disponível em: DOI: 10.1074/jbc.m707821200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18165687>. Acesso em: 10 fev. 2023.

TORRIJOS, R. *et al.* Antifungal activity of natamycin and development of an edible film based on hydroxyethylcellulose to avoid *Penicillium* spp. growth on low-moisture mozzarella cheese. **LWT**, v. 154, p. 112795, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112795. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643821019484>. Acesso em: 6 jul. 2022.

TÜRE, H. *et al.* Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 11, p. 2026-2032, out. 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01816.x. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/229447126_Antifungal_activity_of_biopolymers_containing_natamycin_and_rosemary_extract_against_AspERGILLUS_niger_and_Penicillium_roquefortii Acesso em: 6 jul. 2022.

TURE, H. *et al.* Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 154-160, dez. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02465.x. Disponível em: <https://www.sciencegate.app/document/10.1111/j.1365-2621.2010.02465.x>. Acesso em: 6 jul. 2022.

VAN BOCHOVE, B.; GRIJPMMA, D. W. Mechanical properties of porous photo-crosslinked poly (trimethylene carbonate) network films. **European Polymer Journal**, v. 143, p. 110223, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110223>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305720319406>. Acesso em: 6 jul. 2022.

VARGA, L.; SZIGETI, J. Use of ozone in the dairy industry: A review. **International Journal of Dairy Technology**. v. 69, n. 2, p. 157-168, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12302>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1471-0307.12302>. Acesso em: 18 jan. 2023.

VELPANDIAN, T. *et al.* Novel water soluble sterile natamycin formulation (Natasol) for fungal keratitis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 163, p. 105857, ago. 2021. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.105857. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/350970522_Novel_Water_Soluble_Sterile_Natamycin_Formulation_Natasol_for_Fungal_Keratitis. Acesso em: 6 jul. 2022.

VIDAL, A. M. C.; NETTO, S. A. (org.). **Obtenção e processamento do leite e derivados**. São Paulo, 2018. E-book. Disponível em: <https://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/download/200/181/850?inline=1>. Acesso em: 6 jul. 2022.

VIMONT, A. *et al.* Quantitative antifungal activity of reuterin against food isolates of yeasts and moulds and its potential application in yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, p. 182-188, jan. 2019. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.03.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713517301275>. Acesso em: 4 jul. 2022.

WEBSTER, J.; WEBER, R. (org.). Introduction to fungi. Alemanha: Cambridge University Press, 2007. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511809026>. Acesso em: 6 jul. 2022.

YANGILAR, F.; OĞUZHAN YILDIZ, P. Casein/natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during the ripening of Kashar cheese. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 7, p. 2328-2336, jul. 2016. DOI: 10.1002/jsfa.7348. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.7348>. Acesso em: 6 jul. 2022.

YONG, H. I. *et al.* Pathogen inactivation and quality changes in sliced cheddar cheese treated using flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma. **Food Research International**, v. 69, p. 57-63, mar. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.008>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/270223078_Pathogen_inactivation_and_quality_changes_in_sliced_cheddar_cheese_treated_using_flexible_thinlayer_dielectric_barrier_discharge_plasma. Acesso em: 18 jan. 2023.

YOUSSEF, A. M. *et al.* Development of bionanocomposite materials and its use in coating of Ras cheese. **Food chemistry**, v. 270, p. 467-475, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.114>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618312603>. Acesso em: 18 jan. 2023.

ZALAZAR, A. L. *et al.* Modelling growth/no growth interface of *Zygosaccharomyces bailii* in simulated acid sauces as a function of natamycin, xanthan gum and sodium chloride concentrations. **Food Research International**, v. 116, p. 916-924, fev. 2019. Disponível em: Acesso em: 6 jul. 2022.

ZHAO, Y. *et al.* Unraveling the polypharmacology of a natural antifungal product, eugenol, against *Rhizoctonia solani*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 7, p. 3469-3483, abr. 2021. DOI: 10.1002/ps.6400. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.6400>. Acesso em: 6 jul. 2022.