

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

LARISSA DECKIJ EVERS

**ADAPTAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO OFICIAL DE ANÁLISE DE
FOSFATASE ALCALINA EM LEITE PARA QUEIJOS ARTESANAIS**

PONTA GROSSA

2025

LARISSA DECKIJ EVERS

**ADAPTAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO OFICIAL DE ANÁLISE DE
FOSFATASE ALCALINA EM LEITE PARA QUEIJOS ARTESANAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pertencente ao Setor de Engenharias, Ciências Agrárias e de Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira.

PONTA GROSSA

2025

E93 Evers, Larissa Deckij
Adaptação quantitativa do método oficial de análise de fosfatase alcalina em
leite para queijos artesanais / Larissa Deckij Evers. Ponta Grossa, 2025.
71 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira.

1. Leite cru. 2. Indicador de pasteurização. 3. Cielab. I. Nogueira,
Alessandro. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de
Alimentos. III.T.

CDD: 637.3

TERMO DE APROVAÇÃO

LARISSA DECKIJ EVERS

“Adaptação quantitativa do método oficial de análise de fosfatase alcalina em leite para queijos artesanais”.

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre(a) no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG-PR

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRO NOGUEIRA**
Data: 24/03/2025 21:18:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG-PR - Presidente

Documento assinado digitalmente
 **SIMONE BEUX**
Data: 25/03/2025 09:30:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Simone Beux - UTFPR-PR - Membro Titular Externo

Documento assinado digitalmente
 **ALINE ALBERTI**
Data: 25/03/2025 12:42:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Aline Alberti - UEPG-PR - Membro Titular Interno

Documento assinado digitalmente
 **RENATA DINNIES SANTOS SALEM**
Data: 26/03/2025 13:22:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Renata Dinnies Santos Salem - UEPG-PR - Membro Titular Interno

Ponta Grossa, 24 de março de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Divido Espírito Santo por minha vida, família e amigos!

Agradeço a minha mãe Hissania e ao meu pai Claudio, por todo apoio e incentivo, desde as minhas primeiras conquistas!

Agradeço a Mariane Letícia Martins por ser fonte inesgotável de apoio, carinho, companheirismo, incentivo e paciência! Você é, sem dúvidas, o melhor presente que a UEPG me deu! Obrigada por ser minha dupla!

Ao professor Dr. Alessandro Nogueira, pela orientação, suporte, confiança e tamanho incentivo, além de boas risadas e receitas!

As professoras Dra. Aline Alberti e Dra. Renata Dinnies Santos Salem pelo suporte, ensinamentos e sugestões!

A Denise Maria de Souza Mendes por toda ajuda e paciência!

A todo o Grupo de Trabalho sobre a Maçã e da Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais, em especial a Murilo de Freitas Peres, Thais Estéfane Fischer, Victoria Jimenez Sandoval, Isabela Maria Macedo Simões Sola e Raul Dias, por todo apoio, boas risadas, muito dadinho e café.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela estrutura.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho desde o TCC!

RESUMO

A pasteurização do leite aumenta a segurança microbiológica do queijo. Em produtos elaborados a partir de leite cru, a inocuidade está diretamente relacionada tanto a boas práticas de ordenha quanto de produção. Queijos artesanais são tipicamente produzidos em pequena escala utilizando, na maioria das vezes, leite cru. Nas últimas duas décadas, legislações vêm isentando o tempo mínimo de maturação de 60 dias, antes requerido para comercialização, como forma de garantir sua segurança microbiológica. Nesse contexto, a fosfatase alcalina (FA) é uma enzima intrínseca do leite cru empregada na validação do processo de pasteurização em âmbitos nacional e internacional. Entretanto, a análise da FA em queijos no Brasil não é empregada, e em outros países consiste-se em um método de alto custo, o que dificulta a sua ampla utilização. Desta forma, objetivou-se propor uma nova abordagem analítica a fim de quantificar a atividade da fosfatase alcalina em queijos artesanais. Queijos artesanais elaborados a partir de leite cru e pasteurizado foram maturados durante 70 dias e analisados quanto a atividade da FA a cada 10 dias. Foram avaliados três métodos de extração da enzima do queijo, incluindo dois métodos baseados em extração com solvente orgânico e um método verde, baseado em extração aquosa. A FA foi analisada nos extratos através do método oficial nacional para pesquisa em leite, e a cor obtida como resultado foi submetida a análises de espectrofotometria, abordagem quantitativa de referência para ensaios colorimétricos, e cor instrumental. Por meio dos resultados, observou-se o decaimento da atividade enzimática, em aproximadamente 50%, ao longo dos 70 dias de maturação e que o método de extração adotado influenciou significativamente na atividade enzimática quantificada ($p < 0,05$), com resultados mais expressivos para as extrações utilizando solvente orgânico. No entanto, embora a extração aquosa e atividade enzimática estimada por meio de b^* tenham apresentado limites de detecção e quantificação superiores a 10 mU/g, valor de referência internacional para queijos elaborados a partir de leite pasteurizado, foi possível distinguir claramente queijos elaborados a partir de leite cru e leite pasteurizado. Além disso, eliminou a necessidade de diluição da cor, requerida para análise espectrofotométrica, e quando comparado com o método fluorimétrico de referência, apresentou menor custo associado. A coordenada de cor b^* se mostrou diretamente associada a atividade enzimática, apresentando viabilidade de se tornar um indicador de pasteurização. Este pode ser um primeiro passo para um controle mais assertivo da pasteurização do leite utilizado na elaboração de queijos artesanais pelos órgãos de fiscalização, tanto na garantia de sua segurança quanto no cumprimento de regulamentos específicos de identidade e qualidade.

Palavras-chave: Leite cru. Indicador de pasteurização. CIELAB.

ABSTRACT

Milk pasteurization increases the microbiological safety of cheese. The safety of raw milk products is directly related to good milking and production practices. Artisanal cheeses are typically produced on a small scale, using mainly raw milk. In the last two decades, the 60-day aging rule, previously required for raw milk cheese commercialization as a way of guaranteeing its safety, has been exempted under legislation. In this context, alkaline phosphatase (ALP) is an indigenous raw milk enzyme used as a pasteurization marker both nationally and internationally. However, ALP analysis in cheese is not commonly performed in Brazil, and in other countries it relies on high-cost methods, limiting broader implementation. Therefore, this research aimed to propose a novel analytical approach for the quantification of ALP in artisanal cheeses. Artisanal cheeses made from raw and pasteurized milk were aged for 70 days and evaluated for ALP activity each 10 days. Three methods of enzyme extraction were used, including two methods based on organic solvent extraction, and a green method, based on water extraction. ALP was assessed from the extracts, using the official national method for milk research, and the resulting color was subjected to spectrophotometric analysis, reference quantitative approach for colorimetric assays, and instrumental color analysis. The results showed that the ALP activity decreased by approximately 50% throughout the 70 days of ripening and that the extraction method adopted significantly affected enzyme activity quantified ($p < 0.05$), with higher values for organic solvent extractions. However, although water extraction and enzyme activities estimated by b^* showed detection and quantification limits above 10 mU/g, the international reference value for pasteurized milk cheeses, it was possible to distinguish clearly between raw and pasteurized milk cheeses. Additionally, it eliminates the need of color dilution, required for spectrophotometry analysis, and when compared to the fluorimetric reference method offers lower costs. Color coordinate b^* was directly correlated with ALP activity, making it a suitable pasteurization marker. This could be a first step towards more assertive control of the thermal treatment of milk used in artisanal cheeses manufacturing by inspection agencies, in order to guarantee their microbiological safety and compliance with specific identity and quality regulations.

Keywords: Raw milk. Pasteurization marker. CIELAB.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.1	—	Avanço cronológico da legislação brasileira em relação ao período mínimo de maturação de 60 dias para queijos elaborados a partir de leite cru.....	24
Quadro 1.2	—	Legislações no âmbito federal vigentes que abrangem a produção, comercialização e certificação dos queijos artesanais brasileiros.....	25
Quadro 1.3	—	Descrição dos princípios e faixa de sensibilidade correspondente segundo qual os métodos empregados na avaliação da atividade da fosfatase alcalina podem ser classificados.....	28
Quadro 1.4	—	Estudos envolvendo a avaliação da atividade da fosfatase alcalina em queijos.....	33
Figure 2.1	—	Experimental design for alkaline phosphatase extraction and quantitative approaches adopted.....	51
Figure 2.2	—	Spectral scan of the blue color resulted from analysis of alkaline phosphatase in raw milk.....	57
Figure 2.3	—	Complied of graphical representations.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	— Faixa de concentração (%) dos principais constituintes do leite bovino.....	14
Table 2.1	— Physicochemical and ripening evaluation of 70-day aged artisanal raw and pasteurized milk cheeses.....	55
Table 2.2	— Linear regression and validation parameters obtained from standard calibration curves and alkaline phosphatase assessment.....	59
Table 2.3	— Alkaline phosphatase activity (mU/g) of 70 day-aged artisanal raw milk cheeses.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CRF	<i>Code of Federal Regulations</i>
E.C.	<i>Enzyme Commission Number.</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
FCR	Força Centrífuga Relativa.
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
IDF	<i>International Dairy Federation.</i>
IMCU	<i>International Milk Clotting Units.</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization.</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MS	Ministério da Saúde.
PMO	<i>Pasteurized Milk Ordinance.</i>
PNCEBT	Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal.
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade.
SIF	Serviço de Inspeção Federal.
SISBI-POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal.
RMC	<i>Raw milk cheese</i>
PMC	<i>Pasteurized milk cheese</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	12
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1 DO LEITE AO QUEIJO: UMA VISÃO SOBRE A MATÉRIA-PRIMA E SEU PRINCIPAL PRODUTO.....	13
1.1.1 Leite.....	13
1.1.2 Queijos: Aspectos Gerais, de Produção e Dados de Mercado.....	16
1.1.3 Riscos e Benefícios de Queijos elaborados a partir de Leite Cru.....	18
1.2 QUEIJOS ARTESANAIS BRASILEIROS.....	20
1.2.1 Contextualização.....	20
1.2.2 Legislação Aplicável.....	21
1.3 FOSFATASE ALCALINA.....	26
1.3.1 Fosfatase Alcalina no Leite.....	29
1.3.2 Fosfatase Alcalina em Queijos.....	31
1.3.3 Principais Fatores e Componentes de Influência da Fosfatase Alcalina em Leite e Queijos.....	34
1.3.3.1 Concentração de fosfatase alcalina basal e composição do leite.....	34
1.3.3.2 Fosfatase alcalina de origem microbiana.....	35
1.3.3.3 Reativação da fosfatase alcalina.....	36
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 2 – NOVEL APPROACH ON COLORIMETRIC ASSAYS FOR ALKALINE PHOSPHATASE IN ARTISANAL CHEESES.....	46
ABSTRACT.....	46
2.1 INTRODUCTION.....	46
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	48
2.2.1 Materials.....	48
2.2.2 Methods.....	49
2.2.2.1 Cheese manufacture and sampling.....	49
2.2.2.2 Physicochemical and ripening evaluations.....	50
2.2.2.3 Alkaline phosphatase assessment.....	50
2.2.2.4 Method validation.....	53
2.2.2.5 Statistical analysis.....	54
2.3 RESULTS AND DISCUSSIONS.....	54
2.3.1 Physicochemical and Ripening evaluations of 70-day aged Artisanal Raw and Pasteurized Milk Chesses.....	54
2.3.2 Alkaline Phosphatase Assessment.....	57
CONCLUSION.....	65
ACKNOWLEDGMENTS.....	66
REFERENCES.....	66
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

INTRODUÇÃO

Queijos artesanais caracterizam-se essencialmente pela produção em pequena escala, utilizando leite cru ordenhado na própria fazenda, por meio de técnicas tradicionais de fabricação. Particularidades atreladas a esses fatores são entendidas como responsáveis por atributos de qualidade e padrões de identidade característicos, reflexos das regiões a qual pertencem. No Brasil, denotam grande valor nutricional, cultural, histórico e econômico. Dentre os queijos artesanais brasileiros mais comuns encontram-se aqueles de média umidade ou semiduros, assim classificados em decorrência do teor médio de umidade em sua massa que varia entre 36,0 e 45,9%. Os queijos Colonial, Serrano, Minas Padrão, Meia Cura, Minas do Serro e Minas Artesanal estão entre os principais queijos semiduros artesanais brasileiros.

Durante décadas, a banalização da regulamentação de produção e comercialização de queijos artesanais, além da estreita abrangência das legislações que o continham, afastou o acesso, principalmente de pequenos produtores, ao mercado formal. Queijos produzidos sob informalidade e sem a devida fiscalização podem ser um potencial risco à saúde dos consumidores, visto que, quando elaborados a partir de leite cru, sua segurança estará diretamente relacionada ao emprego de boas práticas desde a ordenha até a pós-produção. Desta forma, submeter o leite ao processo de pasteurização antes da produção do queijo acarreta a inativação de microrganismos com potencial patogênico. Por outro lado, o queijo obtido a partir do leite cru é descrito por apresentar características sensoriais mais intensas, variadas e complexas as quais tornaram-se extensamente apreciadas pelos consumidores.

Atualizações, novas legislações e certificações vêm com objetivo de inserir pequenos produtores de queijos artesanais ao mercado formal de modo a se garantir a segurança e qualidade dos seus produtos, a comercialização interestadual, além de isentar o tempo mínimo de maturação de 60 dias. Como exemplo, tem-se as promulgações dos selos Arte (2018) e Queijo Artesanal (2022). Porém, até a predominante saída desse rumo da informalidade tem-se um longo caminho a ser percorrido.

A normatização da produção, comercialização e certificação do queijo artesanal propicia o egresso, principalmente de pequenos produtores, do mercado informal, agrega valor e permite um produto com características sensoriais únicas garantindo-se, ao mesmo tempo, a segurança de quem o consome. Tal como, concursos promovidos por instituições públicas e/ou privadas nas três esferas tornam-se uma vitrine para a exposição de queijos artesanais, autorais ou não, sobretudo de pequenos produtores. Todavia, verifica-se a necessidade de uma técnica assertiva que comprove a pasteurização ou não do leite utilizado na elaboração dos queijos

artesanais e padronização, tanto dos estudos técnico-científicos voltados para redução do período mínimo de maturação de 60 dias, como dos requisitos microbiológicos para queijos elaborados a partir de leite cru pelos órgãos de fiscalização.

Por conseguinte, a fosfatase alcalina corresponde a uma enzima intrínseca ao leite cru utilizada, em âmbitos nacional e internacional, na validação do processo de pasteurização do leite. Neste contexto, espera-se que a adaptação do método oficial de análise da atividade da fosfatase alcalina em leite, quantitativamente, para queijos coloque à disposição dos órgãos de fiscalização uma forma de atestar a pasteurização da matéria-prima utilizada na fabricação de queijos artesanais, sendo este resultado estratégico para o requerimento ou não de outras análises, de modo a garantir a segurança destes produtos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Adaptar o método oficial de análise da atividade da fosfatase alcalina em leite para sua aplicação quantitativa em queijos, por meio da extração da enzima e da utilização da coordenada de cor CIELAB b^* , de modo que se tenha um indicativo da pasteurização da matéria-prima utilizada em sua produção.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do método de extração da enzima do queijo na análise da atividade da fosfatase alcalina.
- Avaliar a viabilidade da coordenada de cor b^* como possível indicador analítico de eficiência de pasteurização.
- Avaliar a possibilidade de reativação da fosfatase alcalina durante a maturação de queijos.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo apresentará a revisão teórica a respeito do leite como matéria-prima e seu principal derivado, o queijo. Em seguida, serão abordados aspectos contextuais e legais acerca dos queijos artesanais brasileiros e por fim, o histórico da utilização da fosfatase alcalina na indicação da eficiência de pasteurização do leite, estendendo-se aos métodos de análise, regulamentações e principais limitações.

1.1 DO LEITE AO QUEIJO: UMA VISÃO SOBRE A MATÉRIA-PRIMA E SEU PRINCIPAL PRODUTO

1.1.1 Leite

Segundo a legislação brasileira, entende-se por leite “[...] o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (Brasil, 2017), para demais, o leite deve ser designado conforme a espécie que o preceda. Leite cru refrigerado é definido como “[...] o leite produzido em propriedades rurais, refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial” (Brasil, 2018a).

De extensa tradição na alimentação humana, o leite bovino destaca-se tanto na produção quanto consumo, especialmente no ocidente. Por outro lado, em determinadas partes do globo, o leite proveniente de outras espécies também apresenta participação significativa, como leite bubalino e caprino na Índia, ovino na China e camélideo no Quênia, Somália e Paquistão, além do leite proveniente de equinos e cervídeos (Coolbear *et al.*, 2021; FAOSTAT, 2024). A Tabela 1.1 apresenta a faixa de concentração dos principais constituintes do leite bovino.

Tabela 1.1 – Faixa de concentração (%) dos principais constituintes do leite bovino.

Água	87,60
Lactose	4,40 – 6,60
Proteínas	3,00 – 3,90
Caseína total	2,46 – 2,80
Proteína total do soro de leite	0,55 – 0,70
Gordura	3,30 – 5,40
Ácidos graxos (% do total de ácidos graxos)	
Ácidos graxos saturados	55,7 – 72,8
Ácidos graxos insaturados	22,7 – 30,3
Ácidos graxos poliinsaturados	2,4 – 6,3
Ácido linoleico (C18:2)	1,2 – 3,0
Ácido linolênico (C18:3)	0,3 – 1,8

Fonte: Adaptado de Cimmino *et al.*, (2023).

As caseínas representam próximo de 80% das proteínas totais do leite e encontram-se presentes principalmente na forma de micelas, que correspondem a moléculas de caseína interligadas por fosfato de cálcio e interações hidrofóbicas; os quatro principais tipos de caseínas são α_{S1} -, α_{S2} -, β -, e k-caseína (Cimmino *et al.*, 2023; Britten; Giroux, 2022).

Tanto o leite bovino como seus derivados são apontados como parte indispensável da dieta ocidental, uma vez que são consumidos diariamente e se constituem de uma fonte valiosa de macro e micronutrientes (como cálcio, fósforo, vitamina A e α -tocoferol) (Claeys *et al.*, 2014; van den Oever; Mayer, 2021). Em contrapartida, a natureza nutritiva do leite implica em um excelente meio de crescimento para microrganismos (Coolbear *et al.*, 2021), sejam eles desejáveis ou não.

Em relação à microbiota do leite, incluem-se microrganismos patógenos, deteriorantes, biotecnologicamente benéficos (como bactérias ácido lácticas) e outros sem relação benéfica ou prejudicial à qualidade do produto ou a saúde humana (Boor *et al.*, 2017). As bactérias ácido lácticas são bactérias Gram positivas que produzem ácido láctico, utilizando lactose como fonte de carbono, como produto principal da fermentação primária (Rangel-Ortega *et al.*, 2023).

Segundo Coolbear *et al.* (2021) e Fox (2021), as enzimas presentes no leite podem ser classificadas em intrínsecas, endógenas ou exógenas, cada qual segundo a sua procedência. Enzimas intrínsecas correspondem àquelas que adentram ao leite a partir do tecido mamário

(incluem-se células somáticas e sanguíneas). Enzimas endógenas, aquelas secretadas por microrganismos presentes no leite, que podem ser contaminantes ou aqueles adicionados como culturas. Ou ainda, exógenas, aquelas adicionadas com o objetivo tecnológico para fabricação de derivados. Com exceção da quimosina, a seleção e adição de concentrações conhecidas de enzimas ao leite com fim tecnológico possivelmente se deu a partir de meados da década de 1930 (Kosikowski, 1988).

Em 2022, a produção nacional de leite bovino foi próxima 35,7 milhões de toneladas métricas, atingindo a 4ª posição na produção total mundial, atrás de Estados Unidos, Índia e Rússia, consistindo-se na 4ª *commodity* mais produzida no país (FAOSTAT, 2024). Enquanto isso, o consumo aparente *per capita* no mercado formal, isto é, considerando o leite fluido mais produtos lácteos, foi estimado em 130 litros por habitante ano em 2023 (EMBRAPA, 2024).

Todo o leite destinado ao consumo humano deve passar ao menos pelo processo de pasteurização. O processo de pasteurização elimina quase a totalidade das células vegetativas de bactérias com potencial patogênico (salvo esporos), além de reduzir a contagem de microrganismos, inativar enzimas que podem causar a deterioração do produto e minimizar reações químicas e mudanças físicas que podem ocorrer durante o armazenamento (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Coolbear *et al.*, 2021; Deeth, 2021). Este processo não melhora a qualidade do leite, mas garante sua higiene e segurança além de prolongar sua vida de prateleira (2 a 3 semanas sob refrigeração), entretanto, relata-se o impacto sobre sua qualidade sensorial (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Coolbear *et al.*, 2021; van den Oever; Mayer, 2021).

As combinações de tempo-temperatura do processo de pasteurização foram delineadas de forma a inativar as bactérias patogênicas não formadoras de esporos mais termorresistentes do leite: *Mycobacterium tuberculosis*, responsável pela maior parte dos casos de tuberculose em humanos, e *Coxiella burnetii*, responsável por causar a febre Q (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021).

Conforme a combinação tempo-temperatura, a pasteurização pode ser caracterizada como lenta ou LTLT (*Low Temperature Long Time*) ou como rápida ou HTST (*High Temperature Short Time*). Os dois tipos de pasteurização legalmente especificados incluem a pasteurização lenta com aquecimento do leite entre 63°C a 65°C por 30 minutos e pasteurização rápida com aquecimento do leite entre 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos; cada qual respeitando particulares previstas em legislação (Brasil, 2017).

1.1.2 Queijos: Aspectos Gerais, de Produção e Dados de Mercado

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) compreende como queijo:

[...] o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite ou ao leite reconstituído - integral, parcial ou totalmente desnatado - ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, e condimentos ou de aditivos (Brasil, 2017).

Para Britten e Giroux (2022) o principal objetivo da fabricação de queijos é a conversão do leite em um produto estável por meio da coagulação e fermentação. Por outro lado, Almena-Aliste e Mietton (2014) atribuem a diversidade ou variedade a aspectos microbiológicos, incluindo especificações em relação a culturas *starter* e adjuntas ou secundárias, e particularidades de processamento e maturação.

Ainda que haja predominância do leite bovino na produção de queijos, observa-se o uso de outras espécies animais como búfala, cabra e ovelha (Camargo *et al.*, 2021). A conversão do leite em queijo abrange uma combinação de mudanças físicas, bioquímicas e microbiológicas no leite, e pode ser sintetizada em 5 etapas principais: acidificação, coagulação, desidratação (incluem-se aqui as operações que favorecem a sinérese do gel como corte da coalhada, cozimento da massa, mexedura, prensagem e salga), dessoragem e enformagem (Fox; McSweeney, 2017; Penna; Gigante; Todorov, 2021).

Conforme o método utilizado para coagulação do leite, os queijos podem ser classificados em: aqueles resultantes de coagulação enzimática, de coagulação ácida, ou ainda, de coagulação ácida a quente; onde o método escolhido é entendido por influenciar diretamente as características do coágulo formado em termos de estrutura, firmeza e coesão (Almena-Aliste; Mietton, 2014).

A conversão do leite em queijo por coagulação enzimática representa cerca de 70% da produção total de queijos e pode ser dividida em duas fases: a primeira na clivagem da k-caseína entre os aminoácidos 105 (fenilalanina) e 106 (metionina) que se divide em paracaseína (– Fenilalanina¹⁰⁵) e caseinomacropéptido (Metionina¹⁰⁶–) por proteinases selecionadas (como a quimosina), e a segunda, na agregação induzida por interações hidrofóbicas e pontes de cálcio da fração de paracaseína, formando paracaseinato, ou coágulo, onde os glóbulos de gordura são aprisionados (Britten; Giroux, 2022; Fox; McSweeney, 2017).

A maturação refere-se ao acondicionamento do queijo durante um determinado período de tempo, que pode variar de dias, semanas à anos, sob condições específicas de temperatura e umidade relativa. Durante a maturação, sucedem-se uma série de eventos

bioquímicos primários (metabolismo da lactose, lactato e citrato residuais, lipólise e proteólise) e secundários (catabolismo de aminoácidos, de ácidos graxos e ácidos láctico, propiônico, acético e/ou butírico) regulados e controlados por fatores como umidade, salga, pH e especificidade da microbiota e enzimas envolvidas correlacionados diretamente na determinação de características sensoriais específicas (Fox; McSweeney, 2017; Khattab *et al.*, 2019). Esta etapa diferencia queijos frescos ou frescais, de maturados ou curados.

Ademais, Yoon, Lee e Choi (2016) apontam que um processo de maturação adequado é entendido por reduzir o risco microbiológico associado aos queijos elaborados a partir de leite cru, onde estudos demonstram que uma maturação de 60 dias tem um efeito inibidor do crescimento contra microrganismos patógenos, porém não deve ser o único fator levado em consideração, assim como a pasteurização.

No que diz respeito ao tamanho das peças, ressalta-se sua importância tecnológica e não como um fator unicamente estético. Queijos de grande porte, obtidos a partir de coagulação enzimática e com cozimento da massa, apresentam menores teores de umidade, podendo ser submetidos a maturação por vários meses ou até mesmo anos. Por outro lado, variedades de tamanho pequeno e de coagulação ácida apresentam alto teor de umidade e são consumidas majoritariamente frescas (Almena-Aliste; Mietton, 2014). Além do mais, o tamanho propicia o desenvolvimento de características que distinguem os queijos tipo *Brie* e *Camembert*, maturados pelo mesmo fungo (*Penicillium candidum*), assim como o desenvolvimento de olhaduras bem definidas em queijo tipo Emmental por evitar a difusão excessiva de gás carbônico (CO₂).

Muito se discute a respeito da classificação dos queijos, onde a legislação brasileira adota a classificação segundo os conteúdos de matéria gorda no extrato seco e umidade. Segundo a Portaria nº 146/1996 (Brasil, 1996a), de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, os queijos podem ser classificados em: extra gordos ou duplo creme (mínimo de 60%), gordos (45,0 a 59,9%), semi gordos (25,0 a 44,9%), magros (10,0 a 24,9%) e desnatados (< 10,0%); e de acordo com o conteúdo de umidade em: baixa umidade ou massa dura (até 35,9%), média umidade ou massa semidura (36,0 – 45,9%), alta umidade ou massa branda ou “macios” (46,0 – 54,9%) e muito alta umidade ou massa branda ou “mole” (não inferior a 55%).

Em 2021, a produção nacional de queijos alcançou a marca de 760.000 toneladas, onde Mozzarella, Prato e queijos semiduros representaram cerca de 70% da produção (Fitztum *et al.*, 2023). Já a média do consumo *per capita* foi estimada em 5,6 kg por habitante ano (ABIQ, 2021).

1.1.3 Riscos e Benefícios de Queijos elaborados a partir de Leite Cru

O consumo de leite cru bem como de seus derivados, são apontados como desencadeadores de surtos de origem alimentar e representam um risco legítimo a saúde do consumidor (Boor *et al.*, 2017; Claeys *et al.*, 2014; Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Rangel-Ortega *et al.*, 2023). Em países como a França, por exemplo, as autoridades de saúde recomendam que o grupo composto por crianças menores de 5 anos, mulheres grávidas e imunodeprimidos não consumam leite cru ou ainda queijos elaborados a partir deste (France, 2020).

Os queijos obtidos a partir de leite cru apresentam grande importância cultural e econômica em várias partes do mundo (Boor *et al.*, 2017). Suas características sensoriais mais intensas, variadas e complexas, decorrentes do metabolismo da microbiota e enzimas intrínsecas ao leite cru, associadas principalmente a atividade proteolítica e lipolítica, contribuem para o aumento da preferência e procura dos mesmos, que se tornaram tão apreciados pelos consumidores (Britten; Giroux, 2022; O'Sullivan; Cotter, 2017; Yoon; Lee; Choi, 2016). Em contrapartida, aponta-se o risco microbiológico em relação a microrganismos patogênicos associados a estes produtos resultantes de inspeções sanitárias ineficientes, práticas de fabricação inadequadas e manuseio excessivo (Campagnollo *et al.*, 2018).

Ainda que *Listeria monocytogenes* permaneça como principal patógeno de origem alimentar associado a indústria de lácteos (Boor *et al.*, 2017), dentre aqueles com maior incidência na ocorrência de doenças relacionados ao consumo de queijos elaborados a partir de leite cru, incluem-se a *E. coli* enterohemorrágica (associada a produção de shiga toxina), *Salmonella* enterica (incluindo *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Montevideo), *Campylobacter jejuni* e *C. coli* e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (Yoon; Lee; Choi, 2016).

Baixos valores de pH e atividade de água, concentração de cloreto de sódio, assim como bacteriocinas sintetizadas por bactérias ácido lácticas, são retratados como supressores da presença de patógenos como *Listeria monocytogenes* em leite cru e queijos elaborados a partir deste (Pineda *et al.*, 2021). Campagnollo *et al.* (2018) apontam que o risco de listeriose devido ao consumo de queijo de alta ou muito alta umidade é de 6000 a 190 vezes maior quando comparado ao queijo de média umidade ou semiduro, para populações em geral e grupos de risco, respectivamente.

De modo geral, o tratamento térmico do leite acarreta mudanças de cunhos físico, químico, microbiológico, além de aspectos nutricionais e sensoriais, que são diretamente

proporcionais a intensidade do tratamento térmico aplicado (Coolbear *et al.*, 2021; Dash *et al.*, 2022). Com a pasteurização, tem-se a perda de espécies microbianas e enzimas endógenas, assim como desnaturação de enzimas termolábeis inerentes ao leite cru, limitando, desta forma, o potencial do queijo em refletir o ambiente local; além da transferência de cálcio e fosfato da fase solúvel para a fase coloidal, que por sua vez, prejudica as características do coágulo (Britten; Giroux, 2022; Coolbear *et al.*, 2021). Ressalta-se também o alto gasto energético envolvido no processo de pasteurização, assim como o alto custo dos equipamentos associados.

Além da garantia da segurança do produto, no âmbito da produção e comercialização de queijos, a pasteurização do leite é compreendida por prevenir a ocorrência de problemas microbiológicos, durante ou após a fabricação do queijo (Britten; Giroux, 2022). Para além, pode-se entender a pasteurização como facilitadora do processo de exportação destes produtos, uma vez que poucos países permitem a importação de queijos elaborados a partir de leite cru (Yoon; Lee; Choi, 2016).

Entretanto, ressalta-se que o risco de contaminação microbiológica de queijos não depende exclusivamente da pasteurização ou não do leite utilizado em sua elaboração, mas de fatores como higiene do ambiente e dos manipuladores desde a ordenha até a pós-produção, os quais devem ser constantemente monitorados (Dash *et al.*, 2022; Yoon; Lee; Choi, 2016).

Nos Estados Unidos, a partir de dados compreendendo o período entre 2009 a 2014 sobre surtos relacionados ao consumo de leite bovino cru e queijo, vendidos legalmente e ilegalmente no país, estimou-se que o risco de doenças aos consumidores destes produtos em sua forma não pasteurizada é 800 vezes superior quando comparado aos consumidores dos mesmos produtos na forma pasteurizada (Costard *et al.*, 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) não apresenta dados específicos sobre surtos relacionados ao consumo de leite cru, bem como de queijos elaborados a partir deste, mas sim para leite e derivados de forma geral. Dados compreendo os anos de 2007 a 2023 apontam 290 surtos notificados, com 230 surtos confirmados por ensaios clínicos epidemiológicos, laboratoriais bromatológicos, clínicos ou clínicos bromatológicos, totalizando um total de 2101 doentes e 2 óbitos (Brasil, 2023b). Destaca-se que o número de surtos é presumivelmente subnotificado.

1.2 QUEIJOS ARTESANAIS BRASILEIROS

1.2.1 Contextualização

Queijos artesanais são caracterizados particularmente pela produção em pequena escala, utilizando leite ordenhado na própria fazenda, cru ou pasteurizado, com o mínimo de mecanização possível, através da adoção de técnicas tradicionais de fabricação inerentes a cada região, em que variações nestas relacionam-se diretamente às características particulares dos queijos artesanais brasileiros, tanto em questão de identidade quanto de padrões de qualidade (Fitztum *et al.*, 2023; Kamimura *et al.*, 2019b; Pineda *et al.*, 2021; Rangel-Ortega *et al.*, 2023). A Lei nº13.860/2019 define queijos artesanais como:

[...] aquele elaborado por métodos tradicionais, com vinculação e valorização territorial, regional ou cultural, conforme protocolo de elaboração específico estabelecido para cada tipo e variedade, e com emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação (Brasil, 2019d).

Alega-se que a produção de queijos artesanais no Brasil data da segunda metade do século XVIII influenciada pela imigração portuguesa (Pineda *et al.*, 2021). Os queijos artesanais brasileiros apresentam-se em ampla variedade e destacam-se por seus atributos únicos que refletem a riqueza e identidade das diferentes regiões a qual pertencem, apresentando importância nutricional, cultural, histórica e econômica ao país (Kamimura *et al.*, 2019b; Penna; Gigante; Todorov, 2021) e sua demanda é associada à busca progressiva por alimentos menos processados, diferenciados, culturalmente ricos e com identidade única (Pineda *et al.*, 2021).

São entendidos por corresponderem a um papel estratégico na segurança alimentar, assim como fonte de renda da população em territórios de difícil acesso ou distantes das grandes cidades, além de, na maioria dos casos, apresentarem menor valor agregado propiciando o consumo aumentado em tempos de crise econômica (Fitztum *et al.*, 2023; Pineda *et al.*, 2021; Rangel-Ortega *et al.*, 2023).

Considera-se a predominância de bactérias ácido lácticas como característica típica dos queijos artesanais brasileiros (Camargo *et al.*, 2021; Kamimura *et al.*, 2019a). Kamimura *et al.* (2019a) destacam a predominância dos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* bem como diferenças em sua relativa abundância de acordo com o tipo de queijo e região de produção, associadas principalmente a procedência e condições de armazenamento

do leite, processamento do queijo e condições do ambiente. Contaminantes, incluindo os gêneros *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus*, também são apontados.

Minas Gerais detém o papel de destaque na produção dos queijos artesanais brasileiros, sendo que o “modo artesanal de fazer queijo-de-minas” das micro-regiões do Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Alto Paranaíba) é reconhecido, desde 2008, pelo IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional), como patrimônio cultural imaterial brasileiro (Araújo *et al.*, 2020; Penna; Gigante; Todorov, 2021; Pineda *et al.*, 2021).

Os queijos Colonial, Serrano, Minas Padrão, Meia Cura, Minas do Serro e Minas Artesanal estão entre os principais queijos semiduros artesanais brasileiros. Um número significativo de queijos semiduros artesanais ainda é produzido e vendido ilegalmente, o que torna difícil saber a real quantidade produzida (Fitzum *et al.*, 2023). Campagnollo *et al.* (2018) destacam que produtores informais tendem a ser mais propensos a utilizar leite cru para a produção dos queijos.

Para Camargo *et al.* (2021) tanto a qualidade como a inocuidade dos queijos artesanais elaborados a partir de leite cru exigem o cumprimento de rigorosos cuidados higiênicos-sanitários em todas as etapas da cadeia produtiva, além de destacarem que, de acordo com os dados científicos disponíveis, os queijos artesanais brasileiros não atendem de maneira integral os critérios microbiológicos indicados pela legislação vigente, principalmente pela alta contagem microrganismos que evidenciam falhas nas boas práticas de higiene.

1.2.2 Legislação Aplicável

Durante décadas, a banalização da regulamentação de produção e comercialização de queijos artesanais, além da estreita abrangência das legislações que o continham, afastou e impediu o acesso, principalmente de pequenos produtores, ao mercado formal repercutindo em impactos negativos na segurança e qualidade destes produtos (Araújo *et al.*, 2020).

A certificação de Indicação Geográfica (IG) (Lei nº9.279/1996), constituída pela Indicação de Procedência (IP) ou a Denominação de Origem (DO), compreende um primeiro marco de regulamentação da produção e comercialização, agregação de valor, e definição de critérios tanto de identidade como de qualidade e inocuidade destes produtos (Araújo *et al.*, 2020; Kamimura *et al.*, 2019b; Penna; Gigante; Todorov, 2021). A IP associa-se à notoriedade ou renome que determinado país, cidade, região ou localidade detém como ponto de extração, produção ou fabricação de determinado produto ou de prestação de determinado serviço, ao passo que a DO relaciona-se ao *terroir* (lê-se "terruá") incluindo-se fatores humanos (Brasil, 1996b).

Dentre os queijos semiduros artesanais, aqueles portadores deste registro para IP incluem os queijos Minas produzidos nas regiões da Canastra e Serro e no Paraná, o queijo Colonial da colônia de Witmarsum (Araújo *et al.*, 2020; Kamimura *et al.*, 2019b; Penna; Gigante; Todorov, 2021).

A maior parte dos queijos artesanais brasileiros são produzidos a partir de leite cru, em fazendas com pobre ou privada infraestrutura, e ainda não atendem adequadamente aos critérios microbiológicos estabelecidos em legislação (Camargo *et al.*, 2021). Os padrões microbiológicos definidos para queijos comerciais constam-se na Instrução Normativa nº161/2022 (Brasil, 2022a) do MS/ANVISA.

Primeiramente promulgada pela Portaria nº146/1996 (Brasil, 1996a), a maturação mínima de 60 dias objetivou garantir a segurança de queijos elaborados a partir de leite cru, posteriormente, este tempo dispôs-se de possibilidade de redução conforme legislações subsequentes. Esta redução ainda permanece questionável dado a carência nas especificações dos critérios abrangidos pelos estudos técnico-científicos, permitindo, desta forma, diferentes interpretações em função dos diferentes critérios adotados (Araújo *et al.*, 2020). Pineda *et al.* (2021) destacam que estes estudos se baseiam apenas na contagem de microrganismos indicadores, refletindo apenas a condição geral do produto, ou ainda, do ambiente onde foi processado.

A maturação mínima de 60 dias (*60-day aging rule*) foi inicialmente introduzida nos Estados Unidos após 1944, quando o então encarregado pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos (USPHS ou *United States Public Health Service*) publicou uma carta relatando dois graves surtos de febre tifóide, além de outros surtos menores, relacionados ao consumo de queijo, sugerindo que todo o leite destinado à fabricação do mesmo fosse pasteurizado ou que o queijo fosse adequadamente maturado; o que foi posteriormente firmado, em 1950, como padrão nacional pelo FDA (Boor *et al.*, 2017; Jonhson; Nelson; Jonhson, 1990). Uma pesquisa sobre a sobrevivência de *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, e *Salmonella typhi* em queijo Cheddar é relatada como testemunho para a fixação deste período (Jonhson; Nelson; Jonhson, 1990).

Nos Estados Unidos o período mínimo de maturação de 60 dias para queijos elaborados a partir de leite cru é definido pelo Código de Regulamentação Federal 7CRF§58.439, salvo exceções constatadas em 21CRF§133 (United States of America, 2024a; United States of America, 2024b). Em contrapartida, este período mínimo de maturação não é requerido em países da União Europeia, onde queijos elaborados a partir de leite cru são estritamente regulamentados pelo esquema de qualidade que rege as certificações de indicações

geográficas incluindo Denominação de Origem Protegida e Indicação Geográfica Protegida. Na França, os queijos elaborados a partir de leite cru representam cerca de 3/4 do volume total de queijos comercializados com estes selos (France, 2020).

No Brasil, a imposição do período mínimo de maturação de 60 dias foi vista como um entrave na comercialização de queijos artesanais, dado que poderia acarretar a descaracterização do produto e, consequentemente, na menor aceitação pelo consumidor além de comprometer aspectos históricos, sociais e de fabricação (Araújo *et al.*, 2020; Kamimura *et al.*, 2019b). Araújo *et al.* (2020) apresentam o avanço cronológico e de alcance da legislação federal relacionada a queijos artesanais brasileiros. O Quadro 1.1 exibe uma síntese que contempla as legislações referentes ao período mínimo de maturação de 60 dias para queijos elaborados a partir de leite cru ao longo de mais de duas décadas.

Quadro 1.1 – Avanço cronológico da legislação brasileira em relação ao período mínimo de maturação de 60 dias para queijos elaborados a partir de leite cru.

Legislação	Principais instruções relacionadas	Referência
Portaria nº 146	Exclui a obrigatoriedade de pasteurização ou outro tratamento térmico ao leite designado a produção de queijos que serão submetidos a um processo de maturação não inferior a 60 dias a uma temperatura mínima de 5°C.	(Brasil, 1966a).
Resolução nº 7	Limita ao queijo Minas a produção a partir de leite cru; onde o mesmo só poderá ser comercializado após um período de mínimo de 60 dias de maturação em entreposto de laticínios registrado no SIF, conforme termos da Portaria nº 146/96, a contar da data da sua chegada neste estabelecimento.	(Brasil, 2000).
Instrução Normativa nº 30	Permite período mínimo de maturação inferior a 60 dias a queijos artesanais elaborados a partir de leite cru, desde que estudos técnico-científicos atestem a qualidade e inocuidade dos mesmos. O novo período de maturação pode ser definido pelo órgão estadual/municipal de inspeção reconhecido pelo SISBI-POA e limita-se a queijarias situadas em região de indicação geográfica certificada ou tradicionalmente reconhecida, e em propriedades certificadas como livre de tuberculose e brucelose, conforme PNCEBT, ou controladas para brucelose e tuberculose, pelo órgão estadual de defesa sanitária animal, no prazo de até 3 anos.	(Brasil, 2013).
Decreto 9.013	Permite a produção de queijos com leite cru contanto que estes sejam maturados por período mínimo de 60 dias a temperatura superior a 5°C, podendo este tempo ser reduzido em função de estudos que atestem a inocuidade do produto ou em casos previstos no RTIQ.	(Brasil, 2017).
Lei 13.860	O tempo de maturação do queijo elaborado a partir de leite é estabelecido com base em seu processo tecnológico de produção conforme variedade e características específicas. Limita a produção de queijos artesanais com leite cru a queijaria situada em estabelecimento rural certificado como livre de tuberculose e brucelose, conforme PNCEBT, ou controlado para brucelose ou tuberculose, pelo órgão estadual de defesa sanitária animal, no prazo de até 3 anos.	(Brasil, 2019d).

Fonte: Adaptado de Araújo *et al.* (2020).

A datar do início da década de 1990, leis vigentes começaram a ser revisadas e novas leis passaram a ser estabelecidas, intencionando-se, tanto a assegurar a produção de queijos artesanais, com padrões de qualidade e inocuidade, e viabilizar sua comercialização. No entanto, apenas em 2018 começaram a ser promulgadas legislações específicas voltadas à regulamentação da produção, comercialização e certificação de queijos artesanais no Brasil (Araújo *et al.*, 2020). No Quadro 1.2 encontram-se as legislações vigentes que abrangem a produção, comercialização e certificação dos queijos artesanais brasileiros.

Quadro 1.2 – Legislações no âmbito federal vigentes que abrangem a produção, comercialização e certificação dos queijos artesanais brasileiros.

Legislação	Escopo	Referência
Lei nº13.680	Altera a Lei nº 1.283/1950, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal, esta passa a vigorar acrescida do Art. 10-A, que dispõe sobre a instituição do selo Arte e o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal.	(Brasil, 2018b).
Lei nº13.860	Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências.	(Brasil, 2019d).
Instrução Normativa nº28	Define o modelo de logotipo a ser utilizado na rotulagem dos produtos artesanais, conforme estabelecido no Manual de Construção e Aplicação do Selo Arte.	(Brasil, 2019a).
Instrução Normativa nº67	Determina as condições para que os Estados e Distrito Federal realizem a concessão do Selo Arte.	(Brasil, 2019b).
Instrução Normativa nº73	Estabelece o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias atribuídas aos produtores rurais fornecedores de leite destinado à fabricação de produtos lácteos artesanais fundamentais à concessão do selo Arte.	(Brasil, 2019c).
Decreto nº11.099	Regulamenta o Art. 10-A da Lei nº1.283/1950 e a Lei nº13.860/2019 para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Além disso, trata da instituição do selo Queijo Artesanal	(Brasil, 2022c).
Portaria nº531	Estabelece requisitos para a concessão dos selos Arte e Queijo Artesanal pelos órgãos de agricultura e pecuária federal, estaduais, municipal e distrital: define os padrões de numeração de logotipos dos selos de identificação artesanal; e institui o Manual de Auditoria do processo de concessão de selos de Identificação Artesanal.	(Brasil, 2022d).

Fonte: A autora (2023).

Com o selo Arte, permitiu-se a comercialização interestadual de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal (incluem-se lácteos e seus derivados, cárneos e seus derivados, pescados e seus derivados e produtos apícolas), a agregação de valor e a possibilidade de acesso a produtos seguros, do ponto de vista higiênico sanitário, e excepcionais, dado a conceituação artesanal (Brasil, 2018b). Até o Decreto nº9.918/2019, a autorização de concessão do Selo Arte se restringia a órgãos de agricultura e pecuária estaduais ou distrital (Brasil, 2018b; Brasil, 2019b).

A partir do Decreto nº11.099/2022, institui-se o selo Queijo Artesanal, e também determinou-se que produtos alimentícios de origem animal considerados artesanais, poderão ser concedidos dos selos Arte, Queijo Artesanal ou ambos, conforme especificado legalmente, por órgão de agricultura e pecuária federal, estadual, municipal ou distrital, desde que haja vinculação dos produtos a um serviço de inspeção e será competência do mesmo órgão

concessor a fiscalização do produto quanto a sua artesanidade. Já a fiscalização em termos de qualidade e aspectos higiênico-sanitários será de responsabilidade do órgão ao qual o estabelecimento e produto se encontram registrados e da mesma forma, com os selos, o produto poderá ser comercializado em todo o território nacional (Brasil, 2022c).

Serão identificados por selo único específico com indicação Queijo Artesanal, queijos artesanais produzidos a partir de técnicas tradicionais que apresentam vinculação e valorização territorial, local ou cultural, estarão aptos aqueles que condizem com o constatado no Art.6 do mesmo decreto (Brasil, 2022c). Em janeiro de 2023, queijos dos estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul receberam as primeiras autenticações com o selo Queijo Artesanal (Brasil, 2023a). Ademais, estados como Minas Gerais e Paraná dispõem de legislações e regulamentos específicos para fabricação e comercialização de queijos artesanais.

Para Pineda *et al.* (2021) o maior desafio na produção de queijos artesanais relaciona-se aos riscos que envolvem a segurança do produto associados a presença de possíveis patógenos de origem alimentar associados à qualidade do leite cru.

1.3 FOSFATASE ALCALINA

A fosfatase alcalina (E.C. 3.1.3.1) é uma glicoproteína ligada à membrana que catalisa a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico, em pH alcalino, produzindo fosfato e álcool correspondente e foi descrita pela primeira vez por Suzuki, Yoshimura e Takaishi em 1907 em *Uber ein enzym "phytase" das anhydro-oxy-methylen-diphosphorsaure spaltet* (Rankin *et al.*, 2010; Sharma; Pal; Prasad, 2014). Encontra-se amplamente tanto em solos, plantas, micro-organismos, quanto em animais e seres humanos (Fox; Kelly, 2006; Kosikowski, 1988; Sharma; Pal; Prasad, 2014).

Esta enzima é utilizada, em âmbitos nacional e internacional, para validação do processo de pasteurização do leite por apresentar resistência térmica ligeiramente superior aos patógenos não formadores de esporos mais termorresistentes do leite (*Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii*) sobre os quais são estabelecidos os parâmetros de tempo e temperatura de pasteurização (Deeth, 2021; Rankin *et al.*, 2010; van den Oever; Mayer, 2021). A inativação térmica da fosfatase alcalina segue uma cinética de primeira ordem; desta forma a taxa de inativação térmica estará diretamente relacionada à concentração inicial ou basal de fosfatase alcalina, ou seja, a concentração de fosfatase alcalina do leite cru (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Painter; Bradley, 1966).

Atividades elevadas de fosfatase alcalina em leite e/ou produtos lácteos podem sugerir falha no processo de pasteurização do leite, contaminação de leite pasteurizado por leite cru

(por falha de equipamento, operador ou ainda pela má gestão da disposição de matérias-primas e produtos acabados), presença de fosfatase alcalina termoestável de origem microbiana e/ou reativação bioquímica da enzima (Rankin *et al.*, 2010; van den Oever; Mayer, 2021). Desta forma, deve-se compreender claramente os termos técnicos e limitações do método aplicado para a avaliação da atividade enzimática da fosfatase alcalina

Recomenda-se que a avaliação da atividade da fosfatase alcalina seja realizada imediatamente após o tratamento térmico e que potenciais fatores de influência nos resultados de atividade residual sejam considerados na interpretação dos resultados, além disso, indica-se a utilização de controles positivos e negativos (CAC, 2004; Rankin *et al.*, 2010).

A primeira metodologia descrita para a verificação da atividade de fosfatase alcalina no leite foi baseada em colorimetria (Kay; Graham, 1935), onde a atividade enzimática era indicada pela formação de um composto de cor, na qual sua intensidade era diretamente proporcional à concentração de enzima ativa no meio.

De acordo com o seu princípio, os métodos empregados para detectar a atividade de fosfatase alcalina podem ser classificados em três principais tipos: fluorimétricos, colorimétricos e quimioluminescentes; onde variações dos mesmos são reconhecidos como métodos válidos para verificação de pasteurização do leite por órgãos fiscalizadores e para monitoramento na indústria de laticínios (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Rankin *et al.*, 2010).

O Quadro 1.3 apresenta um compilado a respeito da descrição dos princípios bem como sua respectiva faixa de sensibilidade, dada em porcentagem (%) de leite cru em leite pasteurizado, descritas na literatura.

Quadro 1.3 – Descrição dos princípios e faixa de sensibilidade correspondente segundo qual os métodos empregados na avaliação da atividade da fosfatase alcalina podem ser classificados.

Princípio	Descrição	Faixa de sensibilidade ¹	Referência
Colorimétrico	Determinação qualitativa (baseada na observação da cor) ou quantitativa (espectrofotométrica) de fenóis após desfosforilação de diferentes substratos, como fenilfosfato dissódico, pela fosfatase alcalina. A reação do fenol liberado do substrato com uma solução reagente forma um composto cromogênico, onde a intensidade da cor desenvolvida é diretamente proporcional a enzima ativa no meio. Absorbância em equivalência a concentração de enzima ativa no meio.	0,1 – 0,5%	(Clawin-Rädecker <i>et al.</i> , 2021; Rankin <i>et al.</i> , 2010; Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011).
Fluorimétrico	Determinação quantitativa da fluorescência de um composto resultante da hidrólise de um radical fosfato de um substrato de éster monofosfórico aromático não fluorescente pela fosfatase alcalina. Fluorescência em equivalência a concentração de enzima ativa no meio ou a atividade enzimática.	0,003 – 0,006%	(Clawin-Rädecker <i>et al.</i> , 2021; Rankin <i>et al.</i> , 2010; van den Oever; Mayer, 2021).
Quimioluminescente	Determinação quantitativa da quimioluminescência (através de um luminômetro ou dispositivo de contagem de fótons refrigerados) do intermediário fenóxido, proveniente de substratos de adamantil 1,2-dioxetano, que quando desfosforilado pela fosfatase alcalina emite um brilho prolongado de luz. Quimioluminescência em equivalência a atividade enzimática.	0,05 – 0,2%	(Clawin-Rädecker <i>et al.</i> , 2021; Rankin <i>et al.</i> , 2010).

Fonte: A autora (2023).

Nota:¹(% de leite cru em leite pasteurizado).

A partir da sensibilidade, dada em capacidade de detecção de uma determinada porcentagem de leite cru em leite pasteurizado, indica-se a concentração mínima de enzima que o método é capaz de detectar para fornecer um resultado positivo. Quanto maior a sensibilidade do método, maior a probabilidade de se detectar problemas na pasteurização ou contaminação pós processamento.

Métodos alternativos incluem tiras reagentes, métodos eletroquímicos e imunoquímicos, polarografia, microplacas (Rankin *et al.*, 2010; Clawin-Rädecker *et al.*, 2021). Considera-se como atividade de fosfatase alcalina inicial ou basal aquela detectada em leite cru e atividade residual de fosfatase alcalina aquela detectada em leite pasteurizado e/ou produtos obtidos a partir de leite pasteurizado (CAC, 2004; Clawin-Rädecker *et al.*, 2021).

1.3.1 Fosfatase Alcalina no Leite

A fosfatase alcalina é uma das mais de 60 enzimas intrínsecas do leite cru (Fox, 2021). No leite bovino, foi definida como uma molécula dímica de duas subunidades idênticas com massa molecular total de 170 kDa (quilodaltons), com máxima atividade na faixa de pH entre 9,65 e 10,5 e temperatura ótima em 37°C (Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011). Segundo Whitney (1958), Demuth, em 1925, foi o primeiro a relatar a presença de uma hexofosfatase em leite, entretanto, apenas oito anos mais tarde, em 1933, Graham e Kay estabeleceram-na como um componente intrínseco ao leite.

Sendo uma enzima intrínseca, a fosfatase alcalina adentra ao leite pelo tecido mamário, possivelmente decorrente do mecanismo específico de secreção dos glóbulos de gordura, não oferecendo benefícios nutricionais ou sensoriais ao mesmo (Fox, 2021). Não foram encontrados detalhes a respeito da função bioquímica da enzima no leite, conforme critérios de busca utilizados, na bibliografia disponível. Destaca-se o foco da literatura na função da fosfatase alcalina em outros tecidos, como ósseo e hepático.

São relatadas duas isoenzimas, α - e β -fosfatase, as quais encontram-se associadas na membrana do glóbulo de gordura (30-40%) através de ligação ao fosfatidilinositol, e no soro do leite (60-70%), possivelmente associadas a lipoproteínas (Deeth, 2021; Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011; van den Oever; Mayer, 2021). Diante desta distribuição, o leite integral apresenta uma maior atividade enzimática quando comparado ao leite semidesnatado e desnatado, respectivamente.

Sharma, Pal e Prasad (2014) descrevem a fosfatase alcalina como uma metaloenzima onde a presença de três íons metálicos no sítio reativo, dois íons zinco (Zn^{2+}) e um íon magnésio (Mg^{2+}), se fazem essenciais para a atividade enzimática. Na forma ativa, a fosfatase alcalina do leite bovino forma complexos com átomos de zinco (Zn^{2+}) que conferem estabilidade estrutural e propriedades funcionais à mesma (Rankin *et al.*, 2010).

O método de referência internacional para análise da atividade da fosfatase alcalina em leite é fundamentado em fluorimetria e encontra-se descrito na norma ISO 11816-1|IDF 155-1:2024, sendo válido para leite e bebidas à base de leite bovino, ovino ou caprino e leite em pó reconstituído, com resultado expresso em miliunidades de atividade enzimática por litro (mU/L) (ISO, 2024a). O PMO/FDA valida métodos eletrônicos com marca registrada para avaliação da atividade de fosfatase alcalina em leite baseados em fluorimetria (*Advanced Instruments Fluorophos*®) e quimiluminescência (*Charm*® *Paslite* e *Charm*® *Fast Alkaline Phosphatase* e *Neogen Accupoint*® *Alkaline Phosphatase*) (USPHS, 2019).

No leite bovino, na União Europeia, de acordo com o Regulamento de Execução (UE) n°627/2019, e nos EUA, segundo PMO/FDA, admite-se como resultado negativo a atividade de fosfatase alcalina inferior a 350 mU/ L, onde uma unidade de atividade enzimática refere-se a concentração da enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato por minuto, sendo este limite correspondente a contaminação de leite pasteurizado por leite cru em porcentagens variando entre 0,02 a 0,1% (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; European Union, 2019; USPHS, 2019).

Em métodos colorimétricos baseados na liberação de fenol, o resultado pode ser expresso qualitativamente, ou seja, na observação da coloração formada, ou ainda, quantitativamente, em termos de concentração de enzima ativa no meio, usualmente dada em µg (micrograma) de fenol em 0,5 mL (mililitro) de leite (Kosikowski, 1988; Murthy *et al.*, 1992), µg de fenol liberado por minuto por L de leite (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021), ou ainda, µg de fenol liberado por mL de leite (van den Oever; Mayer, 2021). Para a norma ISO 3356|IDF 63:2009, que descreve o antigo método de referência para análise da atividade da fosfatase alcalina em leite, leite em pó, leite em pó, leite em pó, soro de leite e soro de leite em pó, e aplicável para atividades não inferiores a 1 µg de fenol liberado a partir do substrato fenilfosfatodissódico por mL de amostra ou amostra reconstituída, um resultado igual ou superior a 2,5 µg por mL é considerado insatisfatório (ISO, 2009). Já para CAC (2004), níveis de atividade residual abaixo de 10 µg p-nitrofenol equivalente por mL são considerados como garantia da correta pasteurização do leite bem como da ausência de contaminação por leite cru.

Os métodos colorimétricos apresentam limite mínimo de detecção correspondente a 0,1 a 0,5% de leite bovino cru em leite pasteurizado, onde a atividade equivalente a contaminação de 0,1% de leite cru em leite pasteurizado corresponde a 1 µg fenol por mL por 15 minutos, quando determinada espectrofotometricamente utilizando fenilfosfato como substrato, ou ainda, 500 mU/L quando determinada através de método fluorimétrico (*Fluorophos*®), ou seja, superior a 350 mU/L (Deeth, 2021; Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Rankin *et al.*, 2010). À vista disso, em 2009, o método colorimétrico desenvolvido por Scharer em 1940, aplicado até então, passou a não ser mais aceito sob a PMO, entretanto, ainda é aceito em diferentes países (Rankin *et al.*, 2010).

No Brasil, segundo a legislação, o leite pasteurizado deve atestar prova de fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva (Brasil, 2017). A lactoperoxidase ainda é encontrada ativa no leite após pasteurização (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; van den Oever; Mayer, 2021). O teste para avaliação da atividade de fosfatase alcalina em leite encontra-se descrito no manual

de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (Brasil, 2022b) consistindo-se em um ensaio colorimétrico qualitativo.

1.3.2 Fosfatase Alcalina em Queijos

Além do leite, seus derivados, como bebidas lácteas, manteiga e queijos, podem ser avaliados quanto à atividade da fosfatase alcalina para indicação da eficiência do processo de pasteurização do leite utilizado como matéria-prima.

O método de referência internacional para análise da atividade em queijos é fundamentado em fluorimetria e encontra-se descrito na norma ISO 11816-2|IDF 155-2:2024 sendo aplicável para queijos duros, semiduros e macios, desde que qualquer cultura fúngica esteja presente unicamente na superfície e não na parte interior (ISO, 2024b). Ademais, a aplicabilidade do método não é especificada segundo a origem de procedência, seja ela bovina, caprina ou ovina. O PMO/FDA, assim como o MAPA não descrevem um método específico para queijos.

A temperatura de aquecimento da coalhada, assim como o diâmetro da peça de queijo, são apontados como os principais parâmetros de influência para a atividade da fosfatase alcalina em queijos, assim como a alta dispersão nos valores encontrados para a atividade enzimática de queijos elaborados a partir de leite cru podem correlacionar-se a fatores com diferença nas condições de processo e tempo de maturação (Egger; Nicolas; Pellegrino, 2016).

Para queijos duros de grande porte elaborados essencialmente a partir de leite cru e submetidos a temperaturas de cozimento de massa relativamente altas, como Emmental, Grana Padano e Parmigiano-Reggiano, a fosfatase alcalina concentra-se na porção periférica da peça, posto que esta é inativada dentro da forma, durante a moldagem, do centro para extremidade, em consequência do gradiente de temperatura formado em função do contato direto da extremidade da peça com a parede fria da forma (Bisig *et al.*, 2010; Egger; Nicolas; Pellegrino, 2016), justificando desta forma a zona de amostragem adotada por Egger, Nicolas e Pellegrino (2016) e posteriormente adotada pela norma ISO desde 2016 (ISO, 2024). Para queijos semiduros e macios constatou-se que uma amostragem zonal não representa uma melhora nos resultados quanto à avaliação da atividade enzimática (Egger; Nicolas; Pellegrino, 2016).

De maneira oposta ao leite, para queijos não há limite legal estabelecido internacionalmente. Egger, Nicolas e Pellegrino (2016) propõem um limite máximo de 10 mU por g para diferenciar queijos elaborados a partir de leite bovino cru e leite bovino pasteurizado, porém não aplicável a queijos azuis e queijos de massa filada. Para Clawin-Rädecker *et al.*

(2021), os dados disponíveis para queijos produzidos a partir de leite de outras espécies, como ovinos e caprinos, não permitem que limites sejam avaliados e estabelecidos.

A impossibilidade da avaliação da atividade da fosfatase alcalina como indicadora do processo de pasteurização do leite para queijos azuis e queijos de massa filada, dá-se em decorrência da presença de fosfatase alcalina de origem microbiana e inativação da fosfatase durante a etapa de filagem (estiramento da massa com água quente) devido à temperatura alcançada ser acima de 60°C (McMahon; Oberg, 2017), respectivamente.

O Quadro 1.4 apresenta estudos com a aplicação de diferentes métodos na avaliação da atividade da fosfatase alcalina em queijos. A partir deste, infere-se a prevalência da utilização de métodos com princípios fluorimétricos e colorimétricos e a brecha no estudo do comportamento da fosfatase alcalina em queijos artesanais brasileiros, onde este limita-se aos queijos Minas Padrão e Frescal.

Quadro 1.4 – Estudos envolvendo a avaliação da atividade da fosfatase alcalina em queijos.

Princípio	Método	Tipo de queijo	Referência
Colorimetria	Método modificado de Scharer (Murthy et al., 1992).	Minas Padrão.	(Soares <i>et al.</i> , 2013).
	Adaptação do antigo método oficial (MAPA) para pesquisa em leite.	Minas Padrão e Frescal.	(Arruda <i>et al.</i> , 2010).
	Método modificado de Scharer (Murthy et al., 1992).	Queijos azuis (<i>Penicillium roqueforti</i>).	(Rosenthal; Bernstein; Rosen, 1996).
Fluorimetria	ISO 11816-2 IDF 155-2:2003.	Queijos de massa dura, semidura e macios, com exceção de queijos azuis e mofados.	(Cassidy <i>et al.</i> , 2014).
	ISO 11816-2 IDF 155-2:2003.	Queijo elaborados a partir de leite caprino.	(Sosnowski; Rola; Osek, 2015).
	ISO 11816-2 IDF 155-2:2003.	Queijos de massa dura, semidura e macia e fabricados a partir de leite cru, termizado e pasteurizado além de mais de 700 amostras, considerando as mesmas características, de queijos típicos provenientes da França, Itália e Suíça.	(Egger; Nicolas; Pellegrino, 2016).
	ISO 11816-2 IDF 155-2:2016.	Queijo Tipo Fontina.	(Pellegrino <i>et al.</i> , 2021).
	ISO 11816-2 IDF 155-2:2016.	Pecorino Siciliano (DOP ¹).	(Todaro <i>et al.</i> , 2021).
	ISO 11816-2 IDF 155-2:2016.	Pecorino Siciliano (DOP ¹)	(Licitra <i>et al.</i> , 2023).

Fonte: A autora (2023).

Nota:¹DOP: Denominação de Origem Protegida.

No que diz respeito à maturação de queijos, a fosfatase alcalina, assim como a fosfatase ácida, são apontadas na desfosforilação de fosfopeptídeos durante a proteólise, contribuindo para o desenvolvimento de sabor e textura dos queijos (Fox; Kelly, 2006). Shakeel-Ur-Rehman, Farkye e Yim (2005) estudaram o efeito da fosfatase alcalina na maturação de queijos tipo Cheddar maturados por 4 meses, destacando como resultado que a fosfatase alcalina acarretou alterações significativas no teor de umidade e padrões de peptídeos, presumivelmente atribuídos a desfosforilação da caseína e/ou fosfopeptídeos.

1.3.3 Principais Fatores e Componentes de Influência da Atividade da Fosfatase Alcalina em Leite e Queijos

Para que a interpretação dos resultados obtidos através da análise da atividade da fosfatase alcalina não seja errônea na validação do processo de pasteurização, estes devem ser confrontados com possíveis fatores de influência ou interferência passíveis de aumentar ou diminuir a atividade enzimática.

1.3.3.1 Concentração de fosfatase alcalina basal e composição do leite

A fosfatase alcalina está presente no leite de todos os mamíferos, entretanto diferencia-se em atividade e taxa de inativação térmica (Claeys *et al.*, 2014). Como o processo de pasteurização resulta em uma redução logarítmica do nível inicial da enzima ativa presente no leite, o nível residual irá variar conforme o mesmo (CAC, 2004).

A composição do leite, tanto em macro como micronutrientes, enzimas e microbiota variam amplamente entre ruminantes e não ruminantes, e dentro de uma mesma espécie podem variar em função de fatores genéticos (raça), fisiológicos (estágio de lactação, intervalo de ordenha, fermentação do trato digestivo, infecções no úbere), alimentação (valor e composição da energia ingerida) e condições ambientais (efeitos sazonais e regionais) (Claeys *et al.*, 2014; Cimmino *et al.*, 2023). Para Clawin-Rädecker *et al.*, (2021), estas variações podem afetar a inativação da fosfatase alcalina durante a pasteurização.

Segundo Fox e Kelly (2006), assim como Shakeel-Ur-Rehman e Farkye (2011), o nível basal de fosfatase alcalina no leite bovino é elevado no colostro, decaindo para um mínimo dentro de 1 a 2 semanas pós-parto e atingindo um máximo constante após cerca de 25 semanas.

No estudo de Kosikowski (1988), os níveis de atividade, determinados a partir de método colorimétrico, indicaram pasteurização adequada para o leite de cabra bem antes do binômio tempo temperatura ideal para o processo ser atingido. Na comparação entre bovinos, ovinos e caprinos, quando confrontados ao leite bovino, o leite ovino possui nível basal cerca de três vezes maior, e caprinos cerca de três vezes menor (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021). Já na comparação com o leite bubalino, diferença significativa não foi apontada (Sharma *et al.*, 2009).

Através de um levantamento considerando vários estudos, Clawin-Rädecker *et al.* (2021) relataram que o nível basal de fosfatase alcalina em leite bovino possui média de 704,800 mU por L (ISO 11816-11|IDF 155-1:2013). Em termos de concentração de fenol liberado, Kosikowski (1988) mencionou o intervalo compreendendo entre 1000 e 1500 µg de fenol em 0,5 mL e Rankin *et al.* (2010) entre 1800 e 4750 µg fenol por mL de leite. Wilińska *et al.* (2007)

retratam uma diferença estrutural da fosfatase alcalina do leite bovino quando comparada ao ovino, refletida pela maior estabilidade térmica da fosfatase do leite bovino.

Dado que a fosfatase alcalina do leite bovino é relatada encontrando-se associada à membrana do glóbulo de gordura, apresenta-se concentrada no creme. Como consequência, entende-se que o teor de gordura do produto tem influência direta no resultado da avaliação de atividade da enzima, tal como, tem-se que o leite cru desnatado (400 µg por mL) apresenta níveis de atividade bem menores quando comparado ao leite cru integral (800 µg por mL) e ao creme (3500 µg por mL) (CAC, 2004; Kosikowski, 1988; Painter; Bradley, 1997; Rankin *et al.*, 2010). Da mesma forma, compreende-se que produtos com elevados níveis de gordura láctea bovina tendem a apresentar valores de atividade enzimática mais altos (Rankin *et al.*, 2010).

A lactose também é retratada na literatura como um fator de influência na atividade enzimática da fosfatase alcalina, onde seu teor foi associado diretamente à resistência térmica da enzima (Mistry, 1989).

1.3.3.2 Fosfatase alcalina de origem microbiana

A fosfatase alcalina sintetizada por determinadas cepas de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) pode relacionar-se a resultados falso-positivos quanto à verificação da eficácia de pasteurização do leite e seus derivados, como os queijos, particularmente aqueles maturados com microbiota adicionada (Cassidy *et al.*, 2014; Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Rankin *et al.*, 2010; Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011). Estas podem apresentar maior termoestabilidade ou termolabilidade quando comparada à fosfatase alcalina de origem bovina. Segundo Kosikowski (1988), a fosfatase alcalina sintetizada por *Pseudomonas* e *Aspergillus* são ditas como as de maior termoestabilidade.

Conforme a Associação Americana de Saúde Pública (*American Public Health Association*), um teste controle para diferenciação entre fosfatase alcalina do leite e fosfatase alcalina microbiana pode ser conduzido através de uma repasteurização de qualquer amostra com resultado positivo seguida de repetição da análise para avaliação da atividade enzimática (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Rankin *et al.*, 2010). Como resultado, se a atividade não reduzir consideravelmente, infere-se um resultado falso-positivo, ou seja, a atividade refere-se à presença de fosfatase alcalina de origem microbiana termorresistente (Clawin-Rädecker *et al.*, 2021; Rankin *et al.*, 2010; Rosenthal; Bernstein; Rosen, 1996).

Entretanto, Rosenthal Bernstein e Rosen (1996) já demonstraram a ineficácia do teste de diferenciação para queijos azuis inoculados com *Penicillium roqueforti* devido à labilidade

térmica da fosfatase alcalina sintetizada por este fungo, consequentemente, não há como reportar um resultado falso-positivo independentemente da assertiva de que o leite usado para produzir o queijo foi devidamente pasteurizado.

1.3.3.3 Reativação da fosfatase alcalina

A reativação da fosfatase alcalina foi primeiramente identificada por Wright e Tramer (1954). De modo geral, a reativação da fosfatase alcalina aumenta com a elevação da temperatura de pasteurização e diminuição do tempo de retenção (Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011).

A reativação parcial da enzima é relatada para leite exposto a temperaturas superiores a 20°C na presença de íons magnésio (Mg^{2+}), o que pode levar a um resultado falso positivo (van den Oever; Mayer, 2021). A presença de íons metálicos Mg^{2+} e zinco (Zn^{2+}), além de cloreto de sódio (NaCl), são acreditados por possuir um papel instigante na capacidade da fosfatase alcalina recuperar sua atividade, onde Mg^{2+} e Zn^{2+} provocariam uma mudança conformacional na enzima desnaturada necessária para a renaturação (Fox; Kelly, 2006; Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011).

Para leite UHT a extensão da reativação é dependente da temperatura de armazenamento, onde para 6 – 10°C reporta-se praticamente ausência de reativação, aumentando em temperaturas de 17 – 34°C (Deeth, 2021). Fox e Kelly (2006) descrevem 30°C como temperatura ótima de armazenamento para a reativação enzimática, sendo detectável a partir de 6 horas até 7 dias.

O teor de gordura não é relatado como um fator de influência na taxa de reativação enzimática, porém uma etapa de homogeneização antes do tratamento térmico é entendida por diminuir a mesma (Murthy; Cox; Kaylor, 1976).

Testes paralelos de identificação de fosfatase alcalina reativa baseiam-se no aumento da atividade da mesma pela adição de Mg^{2+} à mistura reacional (Fox; Kelly, 2006; Kosikowski, 1988; Rankin *et al.*, 2010; Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011).

Mais detalhes sobre a reativação da fosfatase alcalina específica em queijos não foram encontrados na bibliografia disponível conforme critérios de busca utilizados.

Para mais, segundo revisão de Rankin *et al.* (2010), outros componentes de influência capazes de gerar resultados falso-positivos em testes colorimétricos incluem aditivos não pigmentados e resíduos de antibióticos com grupos fenólicos reativos, como vanilina oxidada a ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzóico e ácido salicílico, e oxitetraciclina e penicilina,

respectivamente, além de produtos lácteos pigmentados. Assim como tem sua atividade inibida por quelantes de metais e fosfato inorgânico (Fox; Kelly, 2006).

1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, destacam-se as recentes iniciativas por parte dos órgãos públicos competentes em impulsionar o mercado formal de queijos artesanais, entretanto, verifica-se a falta de padronização no que diz respeito a estudos técnico-científicos, incluindo os requisitos microbiológicos específicos, para que se garanta a segurança do queijo produzido a partir de leite cru com maturação inferior a 60 dias.

Queijos artesanais produzidos sob informalidade e sem os devidos controles associados a boas práticas, desde a ordenha até a pós-produção, consistem-se em um potencial risco à saúde pública, especialmente quando elaborados a partir de leite cru. A adaptação do método oficial de análise da fosfatase alcalina, quantitativamente, para queijos consiste-se em um primeiro passo para assegurar a pasteurização do leite utilizado na produção de queijos artesanais, assim como de queijos não artesanais que declaram a utilização de leite pasteurizado em sua elaboração, possibilitando um controle e rigor mais assertivos destes produtos pelos órgãos de fiscalização.

De forma geral, verifica-se a falta de estudos envolvendo a avaliação da atividade da fosfatase alcalina em queijos artesanais brasileiros, limitando-se apenas aos queijos Minas Padrão e Frescal, assim como estudos que abordem o seu comportamento ao decorrer da maturação.

REFERÊNCIAS

ABIQ. **Indústria de queijos: como continuar crescendo? Associados participam da 12ª edição do Fórum MilkPoint Mercado**. 2022. Disponível em: <https://www.abiq.com.br/industria-de-queijos-como-continuar-crescendo-associados-participam-da-12a-edicao-do-forum-milkpoint-mercado/>. Acesso em: nov. 2024.

ALMENA-ALISTE, M.; MIETTON, B. Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. **Cheese and Microbes**, p. 39-71, 2014.

ARAÚJO, J. P. A.; CAMARGO, A. C.; CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845–1860, 2020.

ARRUDA, M. L. T.; DA SILVA, M. A. P.; DE OLIVEIRA, R. A.; DOS SANTOS, P. A.; DE OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Pesquisa de enzimas em queijos Minas. **PUBVET**, v. 4, n. 18, Ed. 123, Art. 836, 2010.

BISIG, W.; FRÖHLICH-WYDER, M-T.; JAKOB, E.; WECHSLER, D. Comparison between Emmentaler PDO and generic Emmental cheese production in Europe. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 3, p. 206, 2010.

BOOR, K. J.; WIEDMANN, M.; MURPHY, S.; ALCÁINE, S. A 100-year review: microbiology and safety of milk handling. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9933-9951, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 6 jul. 2022a. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao/#/visualizar/487690> .Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Brasília: MAPA, 2022b. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal-1a_ed-2022assinado.pdf .Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 11.099, de 21 de junho de 2022. Regulamenta o disposto no art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e na Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 jun. 2022c. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2022/Decreto/D11099.htm#art15. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 mar. 2017. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 28, de 23 de julho de 2019. Define, conforme estabelecido no Manual de Construção e Aplicação do Selo Arte, o modelo de logotipo a ser utilizado na rotulagem dos produtos dos estabelecimentos registrados como artesanais nas Secretarias de Agricultura e Pecuária dos Estados e do Distrito Federal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 jul. 2019a. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000028&seqAto=000&valorAno=2019&orgao=GM/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Permite que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 ago. 2013.

Disponível em:

<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000030&seqAto=000&valorAno=2013&orgao=MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 67, de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os requisitos para que os Estados e o Distrito Federal realizem a concessão do selo Arte, aos produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 dez. 2019b. Disponível em:

<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000067&seqAto=000&valorAno=2019&orgao=GM/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do Selo Arte. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2019c. Disponível em:

<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000073&seqAto=000&valorAno=2019&orgao=GM/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar p leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 nov. 2018a. Disponível em:

<https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=INM&numeroAto=00000076&seqAto=000&valorAno=2018&orgao=GM/MAPA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: out. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 jun. 2018b. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/legislacao/LEIN13.680DE14DEJUNHODE2018..pdf/view>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 set. 2019d. Disponível em:

https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2019/lei/113860.htm. Acesso em: abr. 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 de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 1996a. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=POR&numeroAto=00000146&seqAto=000&valorAno=1996&orgao=MARA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 531, de 16 de dezembro de 2022. Estabelece requisitos para concessão dos selos ARTE e Queijo Artesanal pelos órgãos de agricultura e pecuária federal, estaduais, municipais e distrital; define os padrões de numeração de logotipos dos selos de identificação artesanal [...]. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 dez. 2022d. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/legislacao/portaria-mapa-no-531-de-16-de-dezembro-de-2022-dou-imprensa-nacional.pdf/view>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Primeiros selos de queijo artesanal são entregues por municípios de MG e do RS**. 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/primeiros-selos-queijo-artesanal-sao-entregues-por-municipios-de-mg-e-do-rs>. Acesso em: 15 nov. 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 07, de 28 de novembro de 2000. Oficializa os Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu Relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jan. 2001. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=RES&numeroAto=00000007&seqAto=000&valorAno=2000&orgao=DIPOA/SDA/MA PA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Acesso em: abr. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Banco de dados de surtos de DTHA (2000 a 2023)**. 2023b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/banco-de-dados-de-surtos-de-dtha-2000-a-2023>. Acesso em: out. 2024.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 maio 1996b. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9279.htm. Acesso em: abr. 2023.

BRITTEN, M.; GIROUX, H. J. Rennet coagulation of heated milk: A review. **International Dairy Journal**, v. 124, p. 105179, 2022.

CAC. **Report of the 36th Session of the Codex Committee on Food Hygiene**. Rome: Codex Alimentarius Commission, 2004. Disponível em: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-712-36%252Fal04_13e.pdf. Acesso em: out. 2024.

CAMARGO, A. C.; DE ARAÚJO, J. P. A.; FUSIEGER, A.; DE CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393 – 409, 2021.

CAMPAGNOLLO, F. B.; GONZALES-BARRONB, U.; CADAVEZB, V. A. P.; SANT'ANA, A. S.; SCHAFFNERC, D. W. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**, v. 92, p. 370-379, 2018

CASSIDY, S.; DALY, C.; EARLY, J.; ROWE, M. T. Alkaline phosphatase activity in United Kingdom cheeses made from bovine pasteurized milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 297-299, 2014.

CIMMINO, F.; CATAPANO, A.; VILLANO, I.; DI MAIO, G.; PETRELLA, L.; TRAINA, G.; PIZZELLA, A.; TUDISCO, R.; CAVALIERE G. Invited review: Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 5, p. 3072-3085, 2023.

CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188-201, 2014.

CLAWIN-RÄDECKER, I.; DE BLOCK, J.; WILLIS, C.; FELICIO, M. T. D. S.; MESSENS, W. The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurization of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. **EFSA Journal**, v. 19, n. 4, 2021.

COOLBEAR, T.; JANIN, N.; TRAILL, R.; SHINGLETON, R. Heat-induced changes in the sensory properties of milk. **International Dairy Journal**, v. 126, p. 105199, 2022.

COSTARD, S.; ESPEJO, L.; GROENENDAAL, H.; ZAGMUTT, F. J. Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009–2014. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 6, p. 957, 2017.

DASH, K. K.; FAYAZ, U.; DAR, A. H.; SHAMS, R.; MANZOOR, S.; SUNDARSINGH, A.; DEKA, P.; KHAN, S. S. A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. **Food Chemistry Advances**, v. 1, p. 100041, 2022.

DEETH, H. C. Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products. A review. **International Dairy Journal**, v. 121, p. 105104, 2021.

EGGER, L.; NICOLAS, M.; PELLEGRINO, L. Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 963–968, 2016.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2024: Avaliação genética multirracial**. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1164754/anuario-leite-2024-avaliacao-genetica-multirracial>. Acesso em: out. 2024.

EUROPEAN UNION. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 [...]. Official Journal of the European Union, May 17th, 2019. Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2019/627/oj. Acesso em: out. 2024.

FAOSTAT. **Crops and livestock products**. 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: set. 2024.

FITZTUM, A. C.; LIMA, L. S.; JUDACEWSKI, P.; SALEM, R. D. S.; LINDNER, J. de D.; DEMIATE, I. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Evaluation of traditional semi-hard Brazilian cheeses using chemometric tools to identify possible denomination fraud. **International Journal of Dairy Technology**, v. 76, n. 3, p. 616-626, 2023.

FOX, P. F.; KELLY, A. L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 1. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 500-516, 2006.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: an overview. **Cheese**, Academic Press, p. 5-21, 2017.

FOX, P. Enzymology of milk and dairy products: Overview. In: **Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products**, Springer, 1-10, 2021.

FRANCE. Ministère De L'Agriculture Et De La Souveraineté Alimentaire. **Consommation de fromages à base de lait cru : rappel des précautions à prendre**. 2020. Disponível em: <https://agriculture.gouv.fr/consommation-de-fromages-base-de-lait-cru-rappel-des-precautions-prendre>. Acesso em: jun. 2023.

ISO. **ISO 11816-1|IDF 155-1:2024 – Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks**. 4. ed. Geneva: International Organization for Standardization, 2024a. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:11816:-1:ed-4:v1:en>. Acesso em: out. 2024.

ISO. **ISO 11816-2|IDF 155-2:2024 – Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for cheese**. 3. ed. Geneva: International Organization for Standardization, 2024b. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:11816:-2:ed-3:v1:en>. Acesso em: out. 2024.

ISO. **ISO 3356|IDF 63:2009 – Milk – Determination of alkaline phosphatase**. 2. ed. Geneva: International Organization for Standardization, 2009. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:44539:en>. Acesso em: out. 2024.

JOHNSON, E. A.; NELSON, J. H.; JOHNSON, M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part II. microbiology. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 6, p. 519-540, 1990.

KAMIMURA, B. A.; DE FILIPPIS, F.; SANT'ANA, A. S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food microbiology**, v. 80, p. 40-49, 2019a.

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019b.

KAY, H. D.; GRAHAM, W. R. The Phosphatase Test for Pasteurized Milk. **Journal of dairy research**, v. 6, n. 2, p. 191-203, 1935.

KHATTAB, A. R.; GUIRGUIS, H. A.; TAWFIK, S. M.; FARAG, M. A. Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 343-360, 2019.

KOSIKOWSKI, F. V. Enzyme Behavior and Utilization in Dairy Technology. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 3, p. 557–573, 1988.

LICITRA, G.; MARINO, V. M.; MANGIONE, G.; BELVEDERE, G.; DIFALCO, A.; PETRIGLIERI, R.; CACCAMO, M. Effect of cooking temperature on alkaline phosphatase in the production of raw-milk Pecorino cheese. **Journal of Dairy Science**, 2023.

MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Pasta-filata cheeses. In: **Cheese**. Academic Press, p. 1041-1068, 2017.

MISTRY, V. V. Thermal inactivation characteristics of alkaline phosphatase in ultrafiltered milk. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 5, p. 1112-1117, 1989.

MURPHY, G. K., KLEYN, D. H.; RICHARDSON, T.; ROCCO, R. M. Alkaline phosphatase methods. **Standard methods for the examination of dairy products**, 16^a ed., p.413-431, Washington, 1992.

MURTHY, G. K.; COX, S.; KAYLOR, L. Reactivation of alkaline phosphatase in ultra-high-temperature, short-time processed liquid milk products. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 10, p. 1699-1710, 1976.

O’SULLIVAN, O.; COTTER, P. D. Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses. **Cheese**, Academic Press, p. 5-21, 2017.

PAINTER, C. J.; BRADLEY JR, R. L. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time-temperature treatments. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 5, p. 525-530, 1997.

PELLEGRINO, L.; HOGENBOOM, J. A.; ROSI, V.; D’INCECCO, P. Evaluating the authenticity of the raw-milk cheese fontina (PDO) with respect to similar cheeses. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 350, 2021.

PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses: History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021.

PINEDA, A. P. A.; CAMPOS, G. Z.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; FRANCO, B. D. G. de M.; PINTO, U. M. Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 732, 2021.

RANGEL-ORTEGA, S. del C.; CAMPOS-MÚZQUIZ, L. G.; CHARLES-RODRIGUES, A. V.; CHÁVEZ-GONZALÉZ, M. L.; PALOMO-LIGAS, L.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; SOLANILLA-DUQUE, J. F.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. Biological control of pathogens in artisanal cheeses. **International Dairy Journal**, p. 105612, 2023.

RANKIN, S. A.; CHRISTIANSEN, A.; LEE, W.; BANAVARA, D. S.; LOPEZ-HERNANDEZ, A. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5538-5551, 2010.

ROSENTHAL, I.; BERNSTEIN, S.; ROSEN, B. Alkaline Phosphatase Activity in *Penicillium roqueforti* and in Blue-Veined Cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 16–19, 1996.

SHAKEEL-UR-REHMAN; FARKYE, N. Y. Enzymes indigenous to milk: phosphatases. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 314-318, 2011.

SHAKEEL-UR-REHMAN; FARKYE, N. Y.; YIM, B. A preliminary study on the role of alkaline phosphatase in cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 697-700, 2006.

SHARMA, R.; KAUR, S.; RAJPUT, Y. S.; KUMAR, R. Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. **Milchwissenschaft**, v. 64, n. 2, p. 173-175, 2009.

SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269-278, 2014.

SOARES, C. F.; FONSECA, L. M.; LEITE, M. O.; OLIVEIRA, M. C. P. P. Application of Scharer's quantitative method for the determination of residual alkaline phosphatase activity in standard Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1223-1230, 2013.

SOSNOWSKI, M.; ROLA, J. G.; OSEK, J. Alkaline phosphatase activity and microbiological quality of heat-treated goat milk and cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 132-136, 2016.

TODARO, M.; LO PRESTI, V.; MACALUSO, A.; ALLERI, M.; LICITRA, G.; CHIOFALO, V. Alkaline phosphatase survey in Pecorino Siciliano PDO cheese. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1648, 2021.

UNITED STATES OF AMERICA. Code of Federal Regulations (CRF). Title 21, Chapter I, Subchapter B, Part 133. **Cheese and related cheese products**. 2024a. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-133>. Acesso em: out. 2024.

UNITED STATES OF AMERICA. Code of Federal Regulations (CRF). Title 7, Chapter I, Subchapter C, Part 58, Subpart B, Section 58.439. **Cheese from unpasteurized milk**. 2024b. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-7/subtitle-B/chapter-I/subchapter-C/part-58/subpart-B/subject-group-ECFR153eeb7aee3276a/section-58.439>. Acesso em: out. 2024.

USPHS. Food and Drug Administration (FDA). **Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance**. FDA, Washington, DC, 2019. Disponível em: https://www.dshs.texas.gov/sites/default/files/milk/pdf/2019_PMO.pdf. Acesso em: abr. 2023.

VAN DEN OEVER, S. P.; MAYER, H. K. Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 121, p. 105097, 2021.

WHITNEY, R. Mc L. The minor proteins of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 10, p. 1303-1323, 1958.

WILIŃSKA, A.; BRYJAK, J. ILLEOVÁ, V. POLAKOVIC, M. Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 579-586, 2007.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. I. **Journal of Dairy Research**, v. 20, n. 2, p. 177-188, 1954.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K-H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, v. 63, p. 201–215, 2016.

CAPÍTULO 2 - COLOR COORDINATE b^* AS A NOVEL APPROACH TO COLORIMETRIC ASSAYS FOR ALKALINE PHOSPHATASE IN ARTISANAL CHEESE

Larissa Deckij Evers, Mariane Letícia Martins, Alessandro Nogueira*.

Graduate Program in Food Science and Technology, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti 4748, Uvaranas Campus, 84.030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: alessandronog@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Advancements in highly sensitive methodologies for assessing alkaline phosphatase activity have rendered colorimetric methods obsolete under international regulations. Nevertheless, colorimetric approaches remain relevant due to their independence from proprietary reagents and specialized equipment, offering a cost-effective alternative for multifunctional laboratories. Additionally, they retain official status in certain countries. This research aimed to propose a novel quantitative approach to colorimetric assays for alkaline phosphatase activity evaluation, based on CIELAB color coordinate b^* , in addition to its adjustment for cheese analysis. Artisanal cheeses made from raw and pasteurized milk were aged for 70 days and evaluated for alkaline phosphatase activity each 10 days. Three methods for enzyme extraction were used. Enzyme activities were estimated by absorbance and b^* measurements. The results showed that alkaline phosphatase activity in raw milk cheeses decreased throughout the 70 days of ripening and that the extraction method significantly affected enzyme activities quantified. Although water extraction and enzyme estimation by b^* presents limits of detection and quantification above 10 mU/g, it effectively differentiates between raw and pasteurized milk. Additionally, it eliminates the need of color dilution, required for spectrophotometry analysis, and when compared to the fluorimetric reference method offers lower costs. Color coordinate b^* was directly correlated with alkaline phosphatase activity, making it a reliable indicator of pasteurization efficiency. This approach can provide inspection agencies with a practical tool for verifying milk pasteurization in artisanal cheese production, avoiding fraud and enhancing food safety.

Keywords: Raw milk. Pasteurization marker. CIELAB. Cheese ripening.

2.1 INTRODUCTION

Alkaline phosphatase (E.C. 3.1.3.1) is one of the 60 indigenous enzymes of bovine raw milk (Fox, 2021). It is widely used as a marker of the pasteurization process due to its slightly higher thermal resistance (62°C|D-value 1200s; 64°C|D-value 480s) compared to the most thermally resistant non-spore-forming pathogens found in milk (*Mycobacterium tuberculosis* and *Coxiella burnetii*), which establishes the pasteurization time-temperature combination (Deeth, 2021; van den Oever; Mayer, 2021). Thermal inactivation of alkaline

phosphatase follows first-order kinetics (Painter; Bradley, 1997), implying that the rate of inactivation is directly related to the initial or basal concentration of alkaline phosphatase (i.e. in raw milk). Alkaline phosphatase can indicate the adequacy of pasteurization in dairy products such as cheese, as in milk.

Kay and Graham (1935) introduced the first qualitative colorimetric method to assess alkaline phosphatase activity in milk. Based on this, subsequent methods have been developed to enhance sensitivity, reduce analysis time, and enable the quantification of enzyme activity, such as Murthy *et al.* (1992). Colorimetric methods can be described as the evaluation of a chromogenic product resulting from the action of alkaline phosphatase on a specific phosphoric ester substrate. The released intermediate then reacts with a color-forming reagent, allowing the enzyme activity to be estimated indirectly, either qualitatively or quantitatively through spectrophotometry (Rankin *et al.* 2010).

The availability of more sensitive and accurate methods, mainly based on fluorimetry and chemiluminescence, has rendered colorimetric methods obsolete and no longer accepted by international agencies (Clawin-Rädecker *et al.* 2021). However, it remains a viable alternative, as it operates independently of proprietary equipment and reagents, enabling the utilization of multifunctional laboratory resources.

The reference method for cheese analysis is based on fluorimetry and is described in ISO 11816-2|IDF 155-2:2024 (ISO, 2024). Unlike milk, there is no legal limit for alkaline phosphatase activity established for cheese. Egger, Nicolas and Pellegrino (2016) proposed a maximum limit of 10 mU/g (milliunits of enzymatic activity per gram) to distinguish between cheeses made from raw and pasteurized bovine milk, apart from blue cheese and pasta filata cheese. In Brazil, the official method for evaluating alkaline phosphatase activity is based on a qualitative colorimetric assay and applies only to milk (Brasil, 2022).

Brazilian artisanal cheeses are typically produced on a small scale, using farm-produced raw milk and traditional manufacturing techniques (Fitztum *et al.* 2023). These cheeses come in a wide variety and are distinguished by their unique characteristics that reflect the richness and identity of the different regions from which they belong, exhibiting nutritional, cultural, historical and economic importance for the country (Kamimura *et al.* 2019; Penna; Gigante; Todorov, 2021). Most of Brazilian artisanal cheeses are medium-moisture or semi-hard (36.0 to 45.9% m/m).

Major Brazilian semi-hard artisanal cheeses are still produced and sold illegally, which renders it a challenge to ascertain the accurate overall production (Fitztum *et al.* 2023). Campagnollo *et al.* (2018) highlights that informal producers are more likely to utilize raw milk

in cheese production. Furthermore, Pineda *et al.* (2021) emphasize that the primary challenge in the artisanal cheese manufacture in Brazil is the potential associated with the product's safety, which is determined by the quality of the raw milk.

Camargo *et al.* (2021) stated that both the quality and safety of raw milk artisanal cheeses require compliance with strict hygiene and health protocols throughout the production process. They also pointed out that, according to the scientific data available, Brazilian artisanal cheeses do not fully meet the microbiological criteria outlined in current legislation, mainly due to the high prevalence of microorganisms that suggest deficiencies in good hygiene practices.

This research aimed to propose a novel quantitative approach to colorimetric assays for alkaline phosphatase activity assessment, utilizing the color coordinate b^* from the CIELAB system, and adapting this method for artisanal cheese analysis through the evaluation of three methods for alkaline phosphatase extraction.

2.2 MATERIALS AND METHODS

In this study, raw and pasteurized milk cheeses were manufactured, ripened for 70 days and sampled at intervals of 10 days. Physicochemical properties and ripening indices were analyzed to evaluate the influence of milk thermal treatment. For alkaline phosphatase assessment, three methods of enzyme extraction were used. The resulting color was extracted and analysed by spectrophotometry and, as a novel approach, instrumental color, for enzyme activity determination.

2.2.1 Materials

Refrigerated Holstein cattle milk from the first milking was obtained from the Capão da Onça Farm School (FESCON) of the State University of Ponta Grossa (UEPG), Brazil (25° 05' 42" S, 50° 09' 43" W). For cheese manufacturing, freeze-dried milk culture FD-DVS CHN-22 50U (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark), consisting of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc* sp. and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, as well as calcium chloride (Biotech Fermentos e Coagulantes Ltda, Alto Piquiri, Paraná, Brazil) and rennet (BIOMAX Liquid chymosin 600 IMCU/mL) (Biotech Fermentos e Coagulantes Ltda, Alto Piquiri, Paraná, Brazil) were used. All the reagents used in this research were of analytical grade.

2.2.2 Methods

2.2.2.1 Cheese manufacturing and sampling

Artisanal cheeses from raw and pasteurized milk ($n = 12$ for each batch) were manufactured at the pilot plant of the Technological School of Milk and Cheeses of Campos Gerais (ETLQueijos). The cheese protocols were developed and validated for this research, differing only in milk thermal treatment. The raw milk (120 L) had a pH of 6.78 and a lactic acid content of 0.2 g/100mL and was split into two batches (60 L). In the first batch, raw milk was subjected to LTLT (low-temperature long time) pasteurization (63.0 °C for 30 min) in a stainless-steel jacketed tank (AISI 304, 120 L capacity, MecMilk®, Pompéia, Brazil) followed by cooling to the control temperature of 33.0 ± 1.0 °C. For the second batch, raw milk was just heated to the control temperature with a circulation of heated water (Boiler; SuckMilk 100, Erechin, Brazil).

The freeze-dried granules of the ‘LD-type’ mesophilic starter culture were previously diluted in a fraction of milk and then added to the tank and stirred for 10 to 15 min to ensure complete homogenization. Calcium chloride at 40% was added at 0.3 mL/L. Succeeding 45 min, 0.06 mL/L of rennet previously diluted in 10 parts of deionized water was then added to the milk and stirred for 2 to 3 min to uniform homogenization.

After 35 min, with milk coagulation ($\text{pH}_{1\text{st batch}} 6.58 \pm 0.02$; $\text{pH}_{2\text{nd batch}} 6.56 \pm 0.02$), a 1 cm cheese lyre was used to cut the curd. One-third of the whey was drained. The curds were washed with warm water at 55.0 °C up to 36.0 °C and then stirred for 10 to 30 min until the curds were firm to touch and retained their shape when squeezed by hand. The remaining whey was drained ($\text{pH}_{1\text{st batch}} 6.57 \pm 0.01$; $\text{pH}_{2\text{nd batch}} 6.51 \pm 0.02$), and the curd was dry salted at 300 g/100L with sodium chloride (Iodized refined salt, Marlin, Rio Grande do Norte, Brazil) standardized at 100 °C for 12h for humidity and microbial control.

The curds were transferred to molds (10 mm in diameter by 8.5 mm in height, 500 g) with cheesecloth (P-RH250, Jandaplast, Paraná, Brazil) and pressed in two turns of 1 h considering 1 kg per cheese kg to assist whey drainage. The cheeses remained at room temperature (23.5 ± 1.5 °C) overnight for acidification ($\text{pH}_{1\text{st batch}} 6.26 \pm 0.03$ to 5.53 ± 0.05 ; $\text{pH}_{2\text{nd batch}} 6.14 \pm 0.05$ to 4.93 ± 0.00).

To minimize microbial growth on the surface during ripening, a commercial vinyl resin coating special for cheese (El Maestro Quesero, Lactolab, São Paulo, Brazil), based on vinyl acetate copolymer and 0.1% natamycin, was applied after drying at 12.0 °C and 85% relative humidity for 24h in a ripening chamber (MecMilk, São Paulo, Brazil) (day 0 of

ripening). The ripening stage lasted 70 days under the same conditions, with cheese being turned every two days.

Analysis were performed in triplicate every 10 days until the last day of the ripening period. Samples were hermetically sealed and frozen (-18 °C) until further analysis.

2.2.2.2 Physicochemical and ripening evaluations

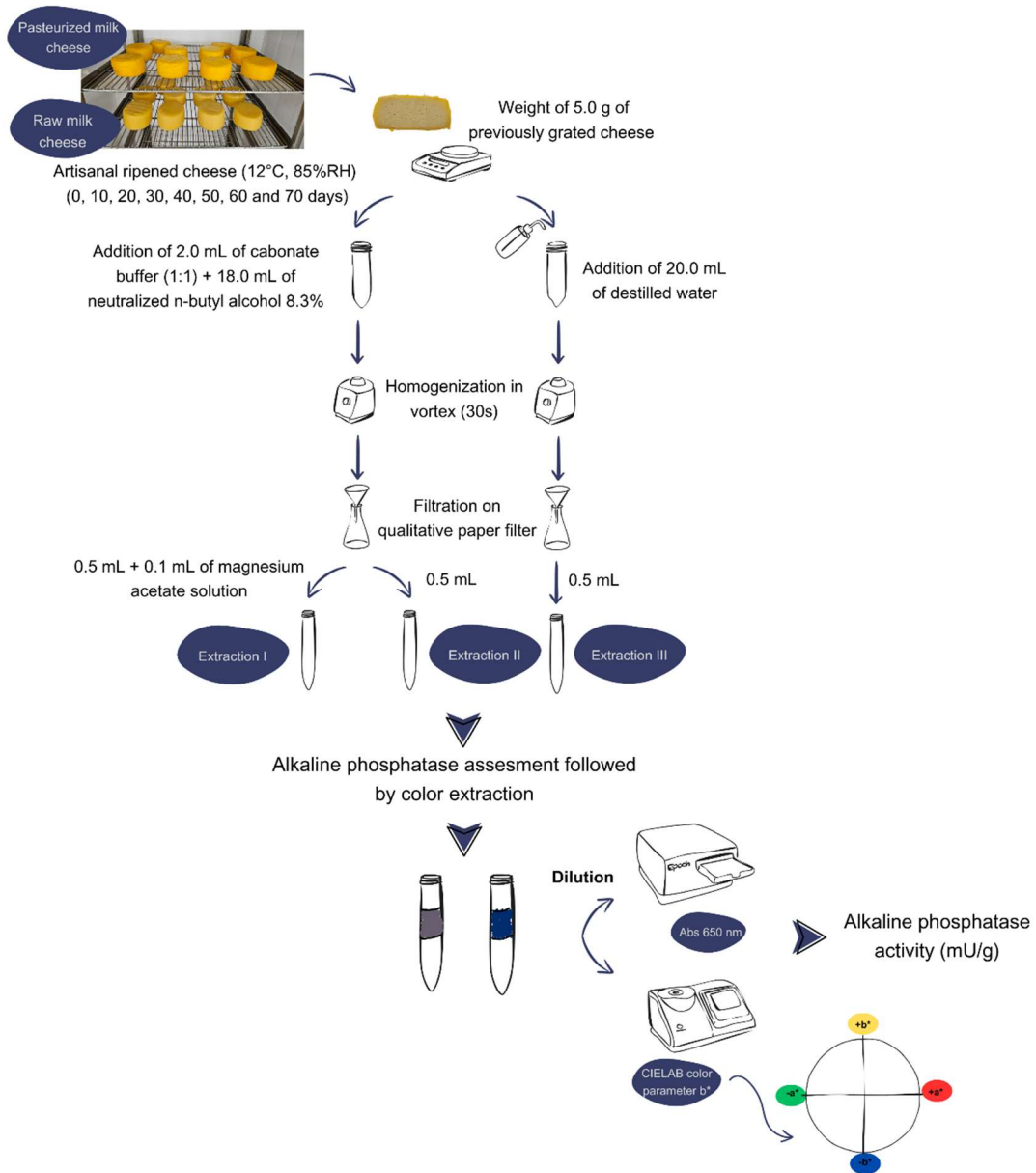
Artisanal cheeses were analysed for moisture (gravimetrically after direct oven drying [model EL-1.4, Odontobrás, Ribeirão Preto, Brazil] at 105 °C to constant weight), ash (incineration in a muffle furnace [model 2310, Fornos Jung Ltd, Blumental, Brazil] at 550 °C for 6h), total nitrogen (Kjeldahl method with a conversion factor of 6.38 for crude protein content) and fat (Gerber butyrometer) contents (IAL, 2008), besides titratable acidity (Brasil, 2006) and pH. The pH was determined using a pH meter (model OneSense pH2500, Marte científica, São Paulo, Brazil) with a universal electrode (2A04, Analyser Comércio e Indústria Ltda, São Paulo, Brazil). To exclude the influence of moisture loss on protein, fat and ash contents, the results were expressed on a dry matter basis.

Proteolysis was assessed by tyrosine concentration and indices of extent (soluble nitrogen at pH 4.6) and depth (soluble nitrogen in 12% trichloroacetic acid) of ripening (Vakaleris; Price, 1959; Fritsch; Martens; Belitz, 1992). Extend and depth of proteolysis were expressed as percentages according to De Rensis, Petenate and Viotto (2009).

2.2.2.3 Alkaline phosphatase assessment

To obtain an extract containing cheese alkaline phosphatase, the method described by Murthy *et al.* (1992), here referred to as Extraction I, was adjusted, and referred to as Extractions II and III. Adjustments aimed at optimizing time and procedures, omitting the addition of magnesium acetate solution, and replacing the organic solvent and buffer by distilled water. Figure 2.1 summarizes the experimental design for alkaline phosphatase extraction and quantitative approaches adopted.

Figure 2.1 – Experimental design for alkaline phosphatase extraction and quantitative approaches adopted.



Source: the authors (2025).

In Extraction I, 2.00 mL of carbonate buffer 1:1(v/v) and 18.0 mL of neutralized n-butyl alcohol 8.3% (v/v) were added to 5.0 g of previously grated cheese. The mixture was homogenized in vortex (Vortex Mixer KMC-1300V, Vision Scientific CO., LTD, Daejeon-Si, Korea) for 30 s and then filtered on qualitative filter paper (Qualy®, 80 g, 125 mm). For the alkaline phosphatase evaluation, 0.5 mL of the extract was mixed with 0.1 mL of magnesium acetate solution (1 mg of magnesium). In Extraction II, the addition of magnesium acetate solution was omitted. In Extraction III, only 20.0 mL of distilled water was added to 5.0 g of

previously grated cheese. The mixture was homogenized in vortex for 30 s and then filtered on qualitative filter paper.

Alkaline phosphatase activity was assessed in 0.5 mL of cheese extracts according to the method under the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) for milk (Brasil, 2022). After the following reaction, the tubes were cooled in ice bath and the resulting indophenol was extracted, adapted from Murthy *et al.* (1992), by adding 3.0 mL of neutralized n-butyl alcohol followed by centrifugation at 2400 x g (FCR) (MPW-351, MPW MED. Instruments, Warsaw, Poland). The resulting alcohol layer was withdrawn with Pasteur pipettes for analysis.

As a novel approach on colorimetric assays for alkaline phosphatase activity assessment, the determination of CIELAB coordinate b^* (chromaticity: +, yellow; -, blue) were proposed for the indophenol extract (blue-colored). b^* were evaluated on a colorimeter (CM-5-ID, Konica Minolta, Osaka, Japan) using a 2.0 mm cell (CM-A97, Konica Minolta, Osaka, Japan).

Comparatively, the absorbance at 650 nm was determined for the indophenol extract according to the reference quantitative approach of colorimetric methods described in the literature (Murthy *et al.* 1992). The absorbance was measured in a microplate reader (Epoch Microplate Spectrophotometer, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) in a 96-well microplate (TPP, model 920, 300 μ L capacity).

Both b^* and absorbance were compared to a standard curve of 2,6-dichloroindophenol sodium salt hydrate p.a. (D03776RA, Êxodo Científica Química Fina Indústria e Comércio Ltda, Sumaré, São Paulo, Brazil) for each extraction subsequent to alkaline phosphatase evaluation and indophenol extraction. The standard curves for absorbance ranged from 0 to 48 μ g/mL and Δb^* from 0 to 480 μ g/mL, eliminating the need of color dilution. For calculus purposes, the values obtained for absorbance and b^* were subtracted from zero standards.

The results were expressed in microunits of alkaline phosphatase activity per cheese gram (mU/g) by equation (1) considering that "...a unit of alkaline phosphatase activity is the amount of alkaline phosphatase enzyme that catalyzes the transformation of 1 micromole of substrate per minute" (EU, 2019).

$$\text{Alkaline phosphatase activity } \left(\frac{mU}{g} \right) = \left(\frac{C \cdot d}{M \cdot t \cdot v} \right) \cdot 1000 \quad (1)$$

where,

- C concentration of 2,6-dichoroindophenol ($\mu\text{g/mL}$) determined from the standard curve.
- d sample dilution, defined as the ratio of the final volume of the prepared extract to the sample mass.
- M molar mass of 2,6-dichoroindophenol (g/mol).
- t reaction time, defined as the period in which the enzyme-substrate interaction occurs under optimized conditions.
- v volume of the cheese extract used in alkaline phosphatase assesment.

The reference solutions (zeros standards) were based on Extractions I, II and III, respectively, excluding cheese.

2.2.2.4 Method validation

Validation of the proposed method included determination of linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy. Linearity was established and represented by the coefficient of determination (R^2) from the plot of standard concentrations *versus* the absorbance at 650 nm or b^* . The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were determined from the parameters of the standard curve (Brasil, 2017) using the following equations (2) and (3), respectively.

$$LOD = \frac{SD \cdot 3.3}{S} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{SD \cdot 10}{S} \quad (3)$$

where,

- SD standard deviation of the intercept with the y-axis.
- S slope of the analytical curve.

Precision was assessed by determining the coefficient of variation (CV%) of the enzymatic activities estimated by the same extraction and instrumental analysis. Accuracy was calculated by determining the coefficient of variation (CV%) of the enzyme activities estimated

by the reference and proposed methods (Ribani *et al.* 2004), i.e. absorbance at 650 nm and color coordinate b^* .

2.2.2.5 Statistical analysis

Experimental data were presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) and Brown-Forsythe ($p < 0.05$) tests confirmed the normality and homoscedasticity of the data. Statistical analyses were performed using analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$), multivariate analysis of variance (MANOVA) ($p < 0.05$), and Fisher's LSD test ($p < 0.05$) differentiation of means. Linear models were used to evaluate the standard curves. The lack of fit ($p < 0.05$) and statistical significance of the regression equation ($p < 0.05$) were determined by ANOVA. Analysis were performed using Statistica 14.1.0.8 (Cloud Software Group, Inc., Palo Alto, California, United States).

Correlation analysis was performed using Pearson's method ($p < 0.05$) in R Studio (R Studio Team, RStudio: Integrated Development Environment for R, Boston, USA).

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

2.3.1 Physicochemical and Ripening evaluations of 70-day aged Artisanal Raw and Pasteurized Milk Cheeses

Table 2.1 summarizes the averages of moisture, dry extract, total protein, fat and ash contents, titratable acid and pH, besides tyrosine levels and percentages of extent and depth of proteolysis for artisanal raw milk cheeses (RMC) and pasteurized milk cheeses (PMC), throughout the ripening period. After 10 and up to 70 days of ripening, moisture loss was significant ($p < 0.05$) for RMC, at 12% on average, and PMC, at 10% on average. Up to 60 d of ripening, RMC could be classified as medium moisture or semi-hard cheese (36.0 to 45.9 g/100g), as well as PMC up to 40 d of ripening (Brasil, 1996). RMC at both 60 and 70 days of ripening showed moisture less than 36.0 g/100g, as well as PMC at 50, 60 and 70 days of ripening, classified as low-moisture or hard cheese (< 39.5 g/100g). The slight excess of moisture loss as well as the differences between RMC and PMC could be related to the size of the chamber and the ventilation system, as stated by Judacewski *et al.* (2016), in addition to the arrangement of the cheeses in the ripening chamber. As a result of moisture loss, an increase in dry extract is observed, more pronounced in RMC compared to PMC, similar to the results found by Rezaei *et al.* (2022).

Table 2.1 – Physicochemical and ripening evaluation of 70-day aged artisanal raw and pasteurized milk cheeses.

Parameters evaluated	Milk thermal treatment	Ripening(d)							
		0	10	20	30	40	50	60	70
Moisture (g/100g)	Raw	44.94 ^a ±0.66	44.49 ^a ±0.08	42.50 ^c ±0.12	40.30 ^e ±0.40	36.80 ^{gh} ±0.19	36.42 ^h ±0.28	35.40 ⁱ ±0.25	32.35 ^k ±0.40
	Pasteurized	43.60 ^b ±0.02	42.96 ^{bc} ±0.50	41.36 ^d ±0.50	38.90 ^f ±0.47	37.47 ^g ±0.50	33.49 ⁱ ±0.60	34.87 ⁱ ±0.85	33.20 ^j ±0.34
Dry Extract (g/100g)	Raw	55.06 ^k ±0.66	55.51 ^k ±0.08	57.50 ⁱ ±0.12	59.70 ^g ±0.40	63.20 ^{de} ±0.19	63.58 ^d ±0.28	64.60 ^c ±0.25	67.65 ^a ±0.40
	Pasteurized	56.40 ⁱ ±0.02	57.04 ^{ij} ±0.50	58.64 ^h ±0.50	61.10 ^f ±0.47	62.53 ^e ±0.50	66.51 ^b ±0.60	65.13 ^c ±0.85	66.80 ^b ±0.34
Total protein* (g/100g)	Raw	45.43 ^d ±0.64	45.00 ^{de} ±0.26	44.13 ^{efg} ±0.78	46.71 ^e ±0.20	44.43 ^{def} ±0.15	44.12 ^{efg} ±1.03	47.21 ^{bc} ±0.81	49.13 ^a ±1.03
	Pasteurized	43.61 ^{fg} ±0.62	43.25 ^{gh} ±0.65	45.41 ^d ±0.79	42.10 ^h ±0.24	44.53 ^{def} ±0.19	46.80 ^c ±0.32	48.32 ^{ab} ±0.34	47.67 ^{bc} ±0.73
Fat* (g/100g)	Raw	53.1 ^{ab} ±0.6	49.8 ^{def} ±2.9	50.4 ^{bcd} ±1.5	49.7 ^{def} ±1.3	47.9 ^{efg} ±0.6	48.8 ^{efg} ±1.1	47.6 ^{fg} ±0.5	49.8 ^{def} ±0.9
	Pasteurized	47.0 ^g ±1.3	53.2 ^a ±2.2	52.9 ^{abc} ±1.2	50.2 ^{cde} ±0.5	48.2 ^{efg} ±1.8	48.5 ^{efg} ±1.6	52.0 ^{abcd} ±0.4	53.1 ^a ±0.0
Ash* (g/100g)	Raw	6.05 ⁱ ±0.21	6.51 ^{gh} ±0.07	6.34 ^h ±0.10	6.65 ^{efg} ±0.02	6.83 ^c ±0.06	7.14 ^{cd} ±0.05	7.35 ^{bc} ±0.08	7.50 ^b ±0.13
	Pasteurized	6.75 ^{ef} ±0.08	6.63 ^{fg} ±0.07	6.82 ^{ef} ±0.02	6.84 ^c ±0.35	7.34 ^{bc} ±0.17	7.09 ^d ±0.07	7.93 ^a ±0.03	7.85 ^a ±0.03
Titrable acidity (g lactic acid/100g)	Raw	0.72 ^j ±0.01	0.95 ^h ±0.03	1.14 ^e ±0.03	1.69 ^a ±0.02	1.59 ^b ±0.07	1.36 ^c ±0.01	1.27 ^d ±0.02	1.69 ^a ±0.09
	Pasteurized	0.71 ^j ±0.03	0.79 ⁱ ±0.04	1.01 ^{gh} ±0.02	1.05 ^g ±0.02	0.95 ^h ±0.01	0.99 ^{gh} ±0.01	1.12 ^{ef} ±0.01	1.05 ^{fg} ±0.04
pH	Raw	4.97 ^h ±0.04	5.06 ^{fg} ±0.03	4.67 ⁱ ±0.02	5.09 ^f ±0.03	5.19 ^{de} ±0.08	5.26 ^{cd} ±0.05	5.61 ^a ±0.11	5.18 ^c ±0.01
	Pasteurized	4.96 ^h ±0.02	5.09 ^f ±0.03	4.99 ^{gh} ±0.03	5.13 ^{ef} ±0.01	5.19 ^{de} ±0.02	5.44 ^b ±0.05	5.48 ^b ±0.06	5.28 ^c ±0.03
Tyrosine (mg/100g)	Raw	59.43 ⁱ ±1.36	70.22 ^h ±1.97	96.02 ^g ±0.08	93.34 ^g ±0.35	67.38 ^{hi} ±6.74	111.80 ^f ±2.02	145.03 ^e ±1.68	192.43 ^d ±0.55
	Pasteurized	89.02 ^g ±1.29	109.31 ^f ±2.11	187.10 ^d ±2.30	148.45 ^e ±0.61	212.51 ^{bc} ±0.19	219.77 ^{ab} ±15.52	207.84 ^c ±0.61	227.56 ^a ±0.80
Extent of Proteolysis (%)	Raw	4.40 ^g ±0.17	7.42 ^f ±0.03	9.43 ^e ±0.27	9.48 ^e ±0.57	17.07 ^{bc} ±2.45	16.92 ^{bcd} ±0.83	19.91 ^a ±3.35	20.29 ^{ab} ±3.29
	Pasteurized	6.48 ^{fg} ±0.00	8.61 ^{ef} ±0.12	10.37 ^e ±0.36	14.63 ^d ±0.65	15.15 ^{bcd} ±0.21	14.95 ^{cd} ±0.21	15.38 ^{bcd} ±1.02	15.91 ^{bcd} ±1.05
Depth of Proteolysis (%)	Raw	2.51 ^m ±0.07	3.83 ^j ±0.36	6.00 ⁱ ±0.08	6.92 ⁱ ±0.07	12.36 ^d ±1.65	14.00 ^c ±0.11	15.89 ^b ±0.23	19.79 ^a ±0.70
	Pasteurized	4.50 ^k ±0.08	7.53 ^h ±0.09	6.40 ⁱ ±0.22	9.04 ^g ±0.94	9.90 ^f ±0.23	10.04 ^f ±0.12	10.21 ^f ±0.08	10.80 ^e ±0.08

Source: the authors (2024).

Notes: *Dry matter basis. Results are reported as the mean ± standard deviation. Different superscripts indicate significant differences between artisanal raw and pasteurized milk cheeses throughout the ripening period by factorial ANOVA followed by Fischer LSD ($p < 0.05$).

Based on the fat content in dry matter (FDM), cheeses could also be classified according to Brasil (1996) as high fat (45.0 to 59.9 g/100g) and significant differences ($p < 0.05$) observed may be related to the method used for fat quantification. In the study by Fitztum *et al.* (2023) all samples of traditional Brazilian artisanal cheeses sold as semi-hard cheeses were classified as high fat. The authors also pointed out that the fat content of milk varies depending on the quality of the milk used for cheese manufacturing, seasonal and genetic factors.

Furthermore, bovine milk alkaline phosphatase is found associated with the fat globule membrane, thus, the fat content has a direct influence on the enzymatic evaluation whether in milk or dairy products (Rankin *et al.* 2010). Since there was no difference in the origin of the milk used for cheese manufacturing, this hypothesis is not considered in the present work.

The increase of titrable acidity and decrease of pH in early stages of ripening is attributed to the production of lactic acid by the lactic acid bacteria (LAB) as a result of lactose fermentation. RMC showed higher levels of titrable acidity and lower levels of pH compared to PMC, which can be attributed to raw milk intrinsic enzymes and LAB, in addition to endogenous enzymes. In this research, the starter culture was added to both RMC and PMC to ensure a standardized protocol, differing only in the thermal treatment of the milk.

Meanwhile, pH values showed a tendency to increase significantly ($p < 0.05$) after 30 d of ripening for RMC and PMC, accompanied by a fluctuation in titrable acidity. These results agreed with Rezaei *et al.* (2022) and Ioannidou, Maggira and Samouris (2022). Rezaei *et al.* (2022) also attribute the pH increase tendency to the inhibitory effect of salt concentration due to moisture loss in LAB and the alkaline compounds resulting from proteolysis in later stages of ripening, such as amino acids and ammonia.

Soluble tyrosine levels include tyrosine as a free amino acid and in peptide bound, as a result of proteolysis as an indicator of cheese ripening (Vakaleris; Price, 1959). Higher tyrosine content is expected for extended ripened cheeses and low tyrosine levels suggest that cheeses are in the early stages of ripening (Fitztum *et al.* 2023). Tyrosine levels increased significantly ($p < 0.05$) throughout the 70 days of ripening.

The extent of proteolysis, estimated by soluble nitrogen at pH 4.6, is related to early proteolysis by the action of residual chymosin, and therefore higher molecular mass peptides. Whereas the depth of proteolysis, estimated by soluble nitrogen at TCA 12%, is related to late proteolysis by the action of microbial enzymes, and therefore lower molecular mass peptides and free amino acids (Moreira *et al.* 2018). Higher values were found for RMC for extent and depth of proteolysis agreeing with Rezaei *et al.* (2022) and Ioannidou, Maggira and Samouris

(2022) that could also be attributed to raw milk intrinsic enzymes and LAB, in addition to endogenous enzymes.

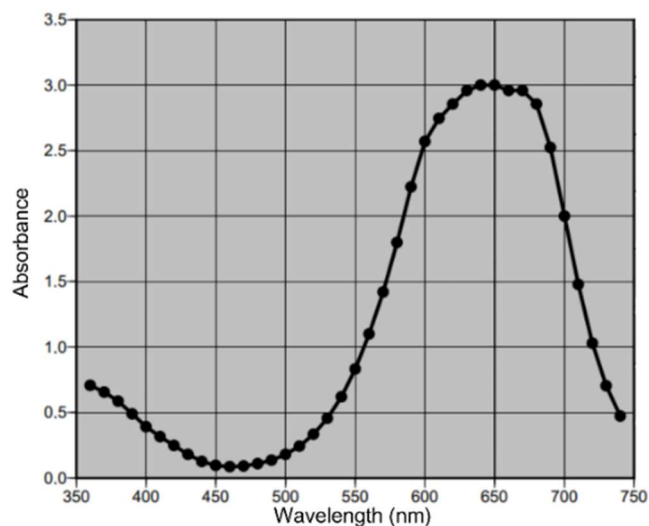
In addition to its composition, milk thermal treatment and ripening conditions play a crucial role in determining the physicochemical properties and ripening indices of cheese. Raw milk cheeses are widely recognized for their more distinctive, diverse and complex sensory attributes; however, consumer awareness regarding their safety is often limited.

2.3.2 Alkaline Phosphatase Assessment

According to the official method of alkaline phosphatase activity of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Brasil, 2022), a positive result is reported qualitatively by the observation of a blue color, the intensity of which is directly related to the lack of pasteurization, or rather to the concentration of active enzyme in the medium.

Quantitative determination of enzyme activity is suggested in the literature by reading the absorbance of the blue color at 650 nm and comparing it with a standard curve (μg indophenol/0.5 mL) (Murthy *et al.* 1992). The blue color refers to the chromogenic product (indophenol) resulting from the action of alkaline phosphatase on the substrate disodium phenyl phosphate dihydrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) at optimum pH and temperature, releasing phosphatase and phenol. The released phenol reacts with the color-forming reagent 2,6-dichloroquinonechlorimide ($\text{C}_6\text{H}_2\text{Br}_3\text{NO}$) in the presence of a catalyst to form indophenol (Rankin *et al.* 2010). The maximum absorption wavelength of 650 nm for the blue color resulted from raw milk analysis was confirmed through a spectral scan on the colorimeter (Figure 2.2).

Figure 2.2 – Spectral scan of the blue color resulted from analysis of alkaline phosphatase in raw milk (Brasil, 2022).



Source: the authors (2023).

In the CIELAB color space, the coordinate b^* negative represents the blue color and is inversely proportional to its intensity (Wrolstad; Smith, 2017), which justifies the novel approach proposed. The authors did not find any scientific literature regarding the application of CIELAB color parameters in enzyme activity determination or other chromogenic products quantification.

The parameters for linear regression and method validation are shown in Table 2.2. Linearity was established and represented by the coefficient of determination (R^2) of the regression equation and R^2 adjusted from the plot of standard concentrations versus the absorbance at 650 nm or the color coordinate b^* . Probability values (p) showed that the models were significant and were well fitted to experimental data.

Table 2.2 – Linear regression and validation parameters obtained from standard calibration curves and alkaline phosphatase assessment.

Extraction	Analytical parameter	Regression equation	R ²	R ² _{adj}	p-value*	p-value**	LOD (mU/g)	LOQ (mU/g)	Precision (%)	Accuracy (%)
I	Absorbance (650nm)	$y = 0.0149x - 0.0228$	0.9323	0.9303	<0.001	0.4683	1.79	5.44	3.10±2.77	6.20±4.75
	Color coordinate (b*)	$y = -0.05x - 6.6749$	0.9839	0.9826	<0.001	0.0917	56.47	171.12	6.81±7.03	
II	Absorbance (650nm)	$y = 0.0129x + 0.034$	0.9923	0.9920	<0.001	0.1438	3.94	11.94	4.41±1.25	9.66±5.85
	Color coordinate (b*)	$y = -0.0471x - 6.4886$	0.9536	0.9510	<0.001	0.9677	68.32	207.02	4.05±2.76	
III	Absorbance (650nm)	$y = 0.0123x + 0.0352$	0.9783	0.9778	<0.001	0.5356	10.32	31.27	3.43±1.09	5.25±3.01
	Color coordinate (b*)	$y = -0.0606x - 5.1165$	0.9929	0.9923	<0.001	0.1354	37.66	114.12	3.32±3.12	

Source: the authors (2025).

Notes: R²: regression coefficient, R²_{adj}: adjusted regression coefficient, *p-values obtained for significance of model, **p-values obtained for lack of fit. Results are expressed as mean ± standard deviation for precision and accuracy.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values obtained indicate that analysis by absorbance is more sensitive than the color coordinate b^* . Analysis by absorbance showed LOD equal or below 10 mU/g. Egger, Nicolas and Pellegrino (2016) suggested a limit of 10 mU/g for pasteurized milk cheeses. Although color coordinate b^* presents higher LOD and LOQ, it emphasized the elimination in need of color dilution for instrumental analysis which is a source of analytical error.

In addition, Egger, Nicolas and Pellegrino (2016) found significant variation between different types of cheese, with values ranging from 9691 to 300 mU/g due to differences in milk sources, cheesemaking protocols, ripening extension and sampling. The results for alkaline phosphatase activity found in this study fall within this range.

Precision and accuracy were estimated by evaluating the coefficient of variation (%). Precision considered the agreement between results obtained from the same extraction and instrumental analysis. Accuracy was assessed based on the agreement between enzymatic activity estimated from b^* values and absorbance (reference method). Reed, Lynn, and Meade (2002) noted that a CV of 20% is commonly used as a reference for acceptable variability in quantitative assays.

For pasteurized milk cheeses, alkaline phosphatase activity was below the limit of detection for all samples regardless of ripening period, extraction and instrumental analysis applied (data not shown). The alkaline phosphatase activity (mU/g) for raw milk cheeses (Table 2.3 and Figure 2.3a) showed a decreasing tendency throughout the 70-day ripening period, regardless of extraction and instrumental analysis applied (absorbance at 650 nm or Color coordinate b^*), confirmed by the values from enzymatic inhibition (%) obtained comparing between days 0 and 70 of ripening.

Table 2.3 – Alkaline phosphatase activity (mU/g) of 70 day-aged artisanal raw milk cheeses.

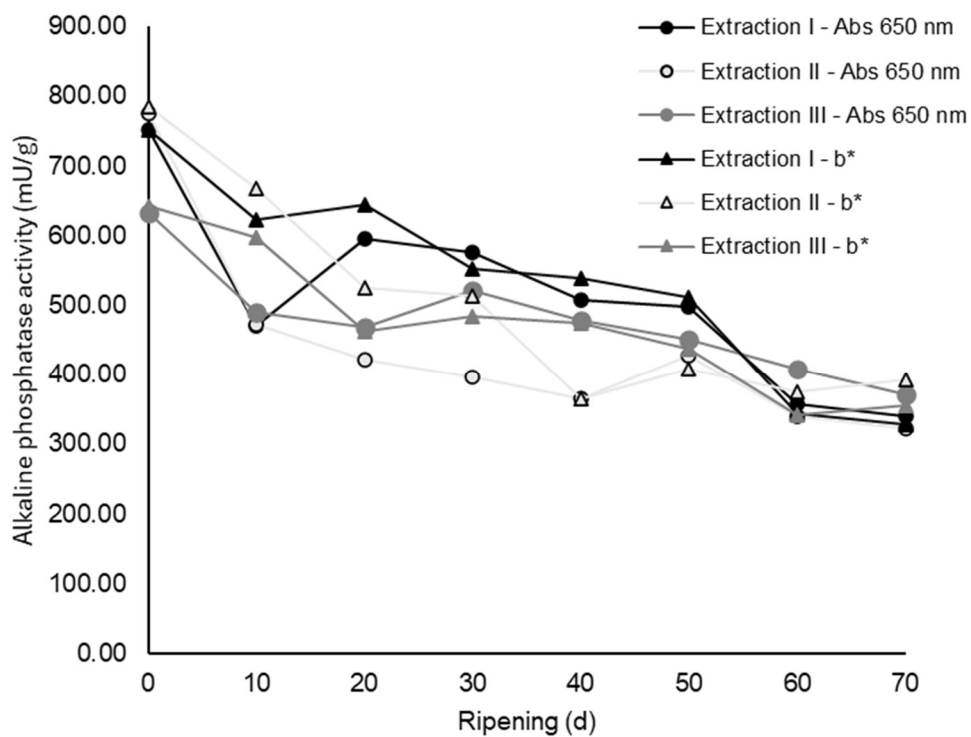
Extraction	Analytical parameter	Ripening(d)								Enzymatic inhibition (%)
		0	10	20	30	40	50	60	70	
I	Absorbance (650nm)	751.55 ^b ±10.75	469.85 ^{ghi} ±12.79	595.56 ^d ±12.21	576.04 ^d ±13.46	507.41 ^{ef} ±14.68	497.86 ^f ±10.32	356.99 ^{op} ±35.08	340.16 ^{nop} ±5.00	54.74
	Color coordinate (b*)	751.57 ^A ±29.36	623.65 ^{BC} ±44.66	644.88 ^B ±23.78	552.13 ^{DE} ±82.68	538.20 ^E ±9.56	511.40 ^{EFG} ±13.06	342.94 ^{LM} ±68.84	328.46 ^M ±1.17	56.30
II	Absorbance (650nm)	775.15 ^a ±37.40	471.96 ^{gh} ±19.49	421.59 ^{klm} ±20.04	396.79 ^m ±21.43	364.76 ⁿ ±16.33	427.58 ^{ikl} ±27.04	339.49 ^{nop} ±9.68	322.18 ^p ±8.16	58.44
	Color coordinate (b*)	785.34 ^A ±2.90	667.50 ^B ±47.41	526.04 ^{EF} ±19.95	513.26 ^{FG} ±37.76	365.85 ^{KLM} ±11.59	408.74 ^{UK} ±0.41	375.17 ^{KLM} ±18.48	391.91 ^{JKL} ±21.74	50.10
III	Absorbance (650nm)	633.80 ^c ±12.83	490.54 ^{fg} ±15.50	468.64 ^{gh} ±21.92	522.29 ^c ±9.36	477.73 ^{hij} ±19.68	451.32 ^{ijk} ±15.26	407.98 ^{lm} ±14.92	370.42 ^{no} ±17.29	41.46
	Color coordinate (b*)	637.51 ^{BC} ±11.80	594.13 ^{CD} ±0.80	463.02 ^{GHI} ±15.29	485.06 ^{FGH} ±24.86	474.29 ^{GH} ±17.11	437.88 ^{HIJ} ±3.22	341.51 ^{LM} ±33.95	355.51 ^{KLM} ±6.76	44.63

Source: the authors (2024).

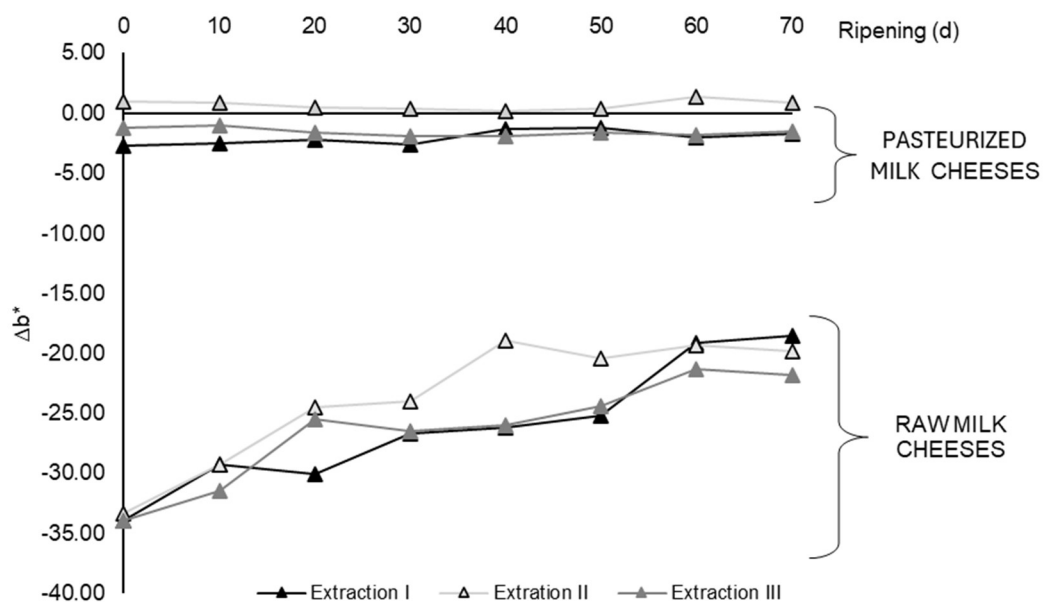
Notes: Results are expressed as mean ± standard deviation. Different lowercase superscripts indicate significant differences in alkaline phosphatase activity by absorbance at 650 nm, while different uppercase superscripts indicate significant differences in alkaline phosphatase activity by color coordinate b* among Extractions I, II, and III over 70 days of ripening. Statistical analysis based on MANOVA followed by Fisher LSD ($p < 0.05$).

Figure 2.3 – Complified of graphical representations.

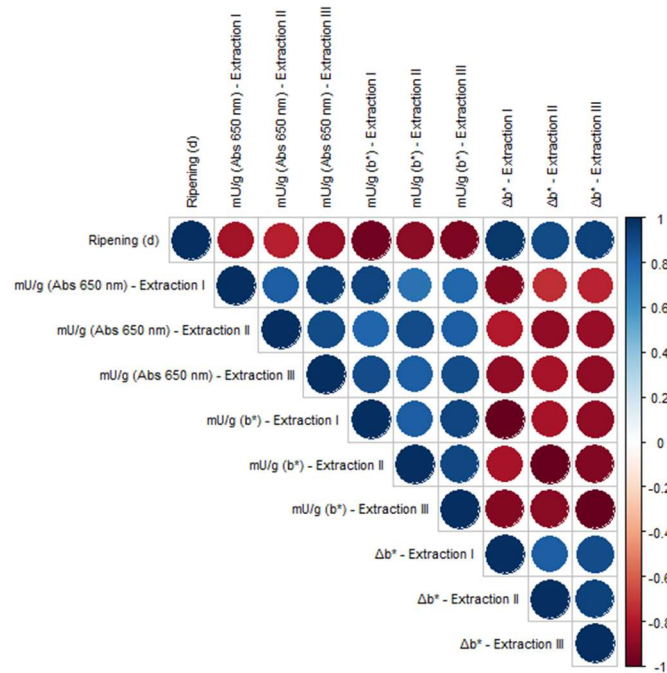
a)



b)



c)



Source: the authors (2024).

Notes: a) Alkaline phosphatase activity (mU/g) of artisanal raw milk cheeses throughout 70 days of ripening. b) Color coordinate b* as an indicator of milk thermal treatment of artisanal cheeses throughout 70 days of ripening. c) Graphical representation of Pearson's correlation ($p < 0.05$) for alkaline phosphatase activity accessed in different extracts (Extraction I, II and III) and quantitative approaches (absorbance and b*).

These findings do not correspond to the hypothesis of enzymatic reactivation during ripening as identified in the literature. In the study carried out by Licitra *et al.* (2023), alkaline phosphatase activity (mU/g) in raw milk Pecorino cheese increases over 3 months of ripening at 16 °C. Sosnowski, Rola and Osek (2016) outlined higher enzymatic activity in ripened soft and hard cheeses by 2 to 15 folds, while Soares *et al.* (2013) reported a possible enzymatic reactivation in standard Minas cheese ripened for 20 days at 10 °C.

Alkaline phosphatase reactivation was first introduced by Wright and Tramer (1954), however it remains not well understood. In milk, it is associated with the storage temperature (Deeth, 2021), presence of Mg^{2+} , and thermal treatment time and temperature combinations (Shakeel-Ur-Rehman; Farkye, 2011). No further information was found in the available literature that met the search criteria regarding alkaline phosphatase reactivation in cheese.

An overlap of the plots for the alkaline phosphatase activity ripening through absorbance and b* is also observed for a same treatment. Thus, it is noteworthy that the CIELAB b* color coordinate has the potential to be used in analyses to replace absorbance readings for high-level concentration measurements when the chromogenic compound exhibits

a blue color, eliminating the need for dilution. The same could be true for yellow (b^* positive), green (a^* negative), and red (a^* positive).

From Figure 2.3b, color coordinate b^* itself could be used to determine whether or not the milk used in artisanal cheese manufacturing has been pasteurized. It has also been observed that the b^* value is inversely proportional to the enzymatic activity and represents the enzyme inactivation throughout ripening.

The method used for enzyme extraction had a direct influence on the amount of enzyme activity quantified, with higher results when neutralized n-butyl alcohol 8.3% was used (Extractions I and II). Of a wide range of solvents already explored, n-butyl alcohol has been described as more efficient in releasing enzymes from insoluble matrices, particularly from lipids and specifically from phospholipids, due to its competition for the polar side chains of the enzymatic structure (Morton, 1950). According to Ahn and Snow (1993), the use of 8% (v/v) n-butanol at room temperature was able to extract more than 90% of enzyme activity from the membranes of bovine milk fat globules.

The addition of magnesium acetate at the tested concentration (1 mg of magnesium) had no significant effect ($p > 0.05$) on enzyme activities quantified. Alkaline phosphatase is a magnesium (Mg^{2+}) and zinc (Zn^{2+}) ion-dependent metalloenzyme (Sharma; Pal; Prasad, 2014), thus it is assumed that Mg^{2+} instigates alkaline phosphatase activity. Murthy and Cox (1988) found that cheese composition may influence phosphatase activation by magnesium, as different cheese types respond differently to its addition.

Pearson's correlation analysis confirmed a decreasing trend throughout ripening and revealed a significant correlation between alkaline phosphatase activities measured in Extractions I, II, and III, irrespective of the instrumental analysis method used, as shown in Figure 2.3c. It also confirmed that enzyme activities and color coordinate b^* are inversely proportional. Red indicates a negative correlation, with greater intensity representing a stronger negative relationship, while blue indicates a positive correlation, with greater intensity representing a stronger positive relationship ($p < 0.05$).

Although color coordinate b^* presents LOD and LOQ above 10 mU/g and enzymatic activity determined by water extraction (Extraction III) was lower, as a novel approach that does not require sample dilution and as water a green solvent, it met the requirement to indicate whether the cheese was produced with raw or pasteurized milk. PMC showed enzymatic activity values that were significantly lower than those found for RMC, which were below the limits of detection.

When comparing the costs of the proposed method to the fluorometric reference method, it would be approximately 30% (US\$) less expensive for an initial investment including equipment and reagents, and approximately 85% (US\$) less expensive per sample analyzed, considering only the reagents used. Costs were estimated using available data on the internet and may vary depending on market prices. The authors emphasize that the fluorimetric reference method is significantly more sensitive and requires less sample weight and analysis time.

However, since Brazilian artisanal cheeses are more likely to be produced with raw milk and sold illegally before the 60-day ripening period, water extraction (Extraction III) followed by evaluation of the color coordinate b^* would be a suitable means of verifying the pasteurization of milk used on cheese manufacturing. Furthermore, water extraction of alkaline phosphatase could be suitable for other proposed methods for alkaline phosphatase activity such as Meena, Jadhav and Badgujar (2021).

This approach could also be used as a fast means to indicate the absence of thermal treatment in milk in cheeses that must be produced with raw milk to comply with specific regulations as stated by Licitra *et al.* (2023) for Pecorino cheese and Bombachi *et al.* (2024) for Minas artisanal cheeses.

2.4 CONCLUSION

This paper focused on suggesting a novel quantitative approach to colorimetric assays for alkaline phosphatase assessment, based on the CIELAB color coordinate b^* , in addition to its adjustment for cheese analysis through evaluation of three methods of alkaline phosphatase extraction.

It was demonstrated that the enzyme extraction method has a significant influence on the quantification of the enzyme activity, with higher values when organic solvent was used; however, water extraction also proved to be effective in identifying whether the cheese was made with raw or pasteurized milk. It was also shown that the numerical value of b^* (negative) is directly related to the enzyme activity and can be used as an analytical parameter of pasteurization efficiency.

In terms of limitations, this study evaluated only cheeses produced under standard conditions. Future research is required to evaluate different classes of cheeses as well as commercial cheeses. In addition, the authors suggest estimating the sensitivity of the proposed method through the production of cheeses with different percentages of raw milk in pasteurized milk as present in literature.

As a result, as well as not relying on proprietary equipment and reagents, it is expected that this approach will provide inspection agencies with a viable method for attesting milk pasteurization used in artisan cheese manufacturing. This approach will be a strategic result in determining fraud or whether further analyses are necessary to ensure these product's safety.

In addition, the use of color coordinates from the CIELAB system for the quantification of enzymatic activity, which has never been described in the literature before, could lead to studies using them for the quantification of other chromogenic compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) [research project number [403626/2022-6], the Araucária Foundation (FA), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) [grant finance code 001].

REFERENCES

AHN, Y. S.; SNOW, L. D. Selective extraction of alkaline phosphatase and 51-nucleotidase from milk fat globule membranes by a single phase n-butanol procedure. **Preparative Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 409-419, 1993.

BOMBACHI, R.; CAMARGO, A. C.; FIRMO, M. J. N.; MENEZES, L. D. M.; FUSIEGER, A.; DE CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Influence of ripening and moisture on the microbiological quality of Minas Artisanal Cheese. **Food Bioscience**, v. 60, p. 104364, 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 jul. 2017. Available in: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Accessed in: Jan. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. Brasília: MAPA, 2022. Available in: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/legislacao-metodos-da-rede-lfd/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal-_1a_ed-_2022_assinado.pdf. Accessed in: Apr. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 dez. 2006. Available in: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-68-de-12-dezembro-de-2006.pdf>. Accessed in: Apr. 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 de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar. 1996. Available in: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=gravarAtoPDF&tipo=POR&numeroAto=00000146&seqAto=000&valorAno=1996&orgao=MARA&codTipo=&desItem=&desItemFim=>. Accessed in: Apr. 2023.

CAMARGO, A. C.; DE ARAÚJO, J. P. A.; FUSIEGER, A.; DE CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393 – 409, 2021.

CAMPAGNOLLO, F. B.; GONZALES-BARRONB, U.; CADAVEZB, V. A. P.; SANT'ANA, A. S.; SCHAFFNERC, D. W. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses. **Food Control**, v. 92, p. 370-379, 2018

CLAWIN-RÄDECKER, I.; DE BLOCK, J.; WILLIS, C.; FELICIO, M. T. D. S.; MESSENS, W. The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. **EFSA Journal**, v. 19, n. 4, 2021.

DE RENSIS, C. M. V. B.; PETENATE, A. J.; VIOTTO, W. H. Chemical composition, rheological and sensorial characterization of reduced fat Prato cheese. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 488-494, 2009.

DEETH, Hilton C. Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products. A review. **International Dairy Journal**, v. 121, p. 105104, 2021.

EGGER, L.; NICOLAS, M.; PELLEGRINO, L. Alkaline phosphatase activity in cheese as a tracer for cheese milk pasteurization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 963–968, 2016.

EUROPEAN UNION. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 [...]. **Official Journal of the European Union**, May 17th, 2019. Available in: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2019/627/oj. Accessed in: Oct. 2024.

FITZTUM, A. C.; LIMA, L. S.; JUDACEWSKI, P.; SALEM, R. D. S.; LINDNER, J. de D.; DEMIATE, I. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Evaluation of traditional semi-hard Brazilian cheeses using chemometric tools to identify possible denomination fraud. **International Journal of Dairy Technology**, v. 76, n. 3, p. 616-626, 2023.

FOX, P. Enzymology of milk and dairy products: Overview. In: **Agents of Change: Enzymes in Milk and Dairy Products**, Springer,. 1-10, 2021.

FRITSCH R. J.; MARTENS, F.; BELITZ, H. D. Monitoring Cheddar cheese ripening by chemical indices of proteolysis 1. Determination of free glutamic acid, soluble nitrogen, and liberated amino groups. **Z Lebensm Unters Forch**, 330–336, 1992.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Primeira edição eletrônica, 2008. Available in: https://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf. Accessed in: Apr. 2023.

IOANNIDOU, M. D.; MAGGIRA, M.; SAMOURIS, G. Physicochemical characteristics, fatty acids profile and lipid oxidation during ripening of graviera cheese produced with raw and pasteurized milk. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2138, 2022.

ISO. **ISO 11816-2|IDF 155-2:2024 – Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for cheese**. 3. ed. Geneva: International Organization for Standardization, 2024b. Available in: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:11816:-2:ed-3:v1:en>. Accessed in: Oct. 2024.

JUDACEWSKI, P.; LOS, P. R.; BENVENUTTI, L.; ALBERTI, A.; SIMÕES, D. R.; NOGUEIRA, A. Quality assessment of white mold-ripened cheeses manufactured with different lactic cultures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 11, p. 3831-3837, 2016.

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019b.

KAY, H. D.; GRAHAM, W. R. The Phosphatase Test for Pasteurised Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 6, n. 2, p. 191-203, 1935.

LICITRA, G.; MARINO, V. M.; MANGIONE, G.; BELVEDERE, G.; DIFALCO, A.; PETRIGLIERI, R.; CACCAMO, M. Effect of cooking temperature on alkaline phosphatase in the production of raw-milk Pecorino cheese. **Journal of Dairy Science**, 2023.

MEENA, K. R.; JADHAV, V. J.; BADGUJAR, P. C. Development of a HPLC fluorescence method for determining efficacy of milk pasteurization. **Food Analytical Methods**, v. 14, n. 2, p. 260-267.

MOREIRA, G. M. M.; COSTA, R. G. B.; TEODORO, V. A. M.; PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D.; FERNANDES, C.; GLORIA, M. B. A. Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 98, p. 583-590, 2018.

MORTON, R. K. Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. **Nature**, v. 166, n. 4235, p. 1092-95, 1950.

MURPHY, G. K., KLEYN, D. H.; RICHARDSON, T.; ROCCO, R. M. Alkaline phosphatase methods. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 16^a ed., p.413-431, Washington, 1992.

MURTHY, G. K.; COX, S. Evaluation of APHA and AOAC methods for phosphatase in cheese. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 71, n. 6, p. 1195-1199, 1988.

PAINTER, C. J.; BRADLEY JR, R. L. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time-temperature treatments. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 5, p. 525-530, 1997.

PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses: History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021.

PENNER, M. H. Ultraviolet, Visible and Fluorescence Spectroscopy. In: **Food Analysis**, p. 89-106, 2017.

PINEDA, A. P. A.; CAMPOS, G. Z.; PIMENTEL-FILHO, N. J.; FRANCO, B. D. G. de M.; PINTO, U. M. Brazilian artisanal cheeses: diversity, microbiological safety, and challenges for the sector. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 732, 2021.

RANKIN, S. A.; CHRISTIANSEN, A.; LEE, W.; BANAVARA, D. S.; LOPEZ-HERNANDEZ, A. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5538-5551, 2010.

REED, G. F.; LYNN, F.; MEADE, B. D. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1235-1239, 2002.

REZAEI, A.; ALIREZALU, K.; DAMIRCHI, S. A.; HESARI, J.; PAPADEMAS, P.; DOMÍNGUEZ, R.; LORENZO, J. M.; YAGHOUBI, M. Effect of pasteurization and ripening temperature on chemical and sensory characteristics of traditional Motal cheese. **Fermentation**, v. 6, n. 4, p. 95, 2020.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SHAKEEL-UR-REHMAN; FARKYE, N. Y. Enzymes indigenous to milk: phosphatases. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 314-318, 2011.

SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269-278, 2014.

SOARES, C. F.; FONSECA, L. M.; LEITE, M. O.; OLIVEIRA, M. C. P. P. Application of Scharer's quantitative method for the determination of residual alkaline phosphatase activity in standard Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1223-1230, 2013.

SOSNOWSKI, M.; ROLA, J. G.; OSEK, J. Alkaline phosphatase activity and microbiological quality of heat-treated goat milk and cheeses. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 132-136, 2016.

VAKALERIS, D. G.; PRICE, W. V. A Rapid Spectrophotometric Method for Measuring Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 42, n. 2, p. 264–276, 1959.

VAN DEN OEVER, S. P.; MAYER, H. K. Analytical assessment of the intensity of heat treatment of milk and dairy products. **International Dairy Journal**, v. 121, p. 105097, 2021.

WRIGHT, R. C.; TRAMER, J. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. I. **Journal of Dairy Research**, v. 20, n. 2, p. 177-188, 1954.

WROLSTAD, R. E.; SMITH, D. E. Color analysis. In: **Food Analysis**, p. 545-555, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da adaptação do método oficial de análise de fosfatase alcalina em leite, quantitativamente, para queijos através da coordenada de cor b^* , foi possível propor um método analítico, de baixo custo, que atesta a pasteurização do leite utilizado na elaboração de queijos, desde o preparo da amostra até a análise dos resultados, utilizando reagentes e equipamentos multifuncionais de laboratório. Através da análise da atividade enzimática ao decorrer dos 70 dias de maturação foi possível observar o comportamento da enzima, que decaiu.

Estes resultados são primordiais para trabalhos futuros que busquem a implementação de um limite para atividade enzimática da fosfatase alcalina pelos órgãos reguladores, que poderá ser dado em função da coordenada de cor b^* . Além de consistir-se de um resultado estratégico para o requerimento ou não de outras análises de modo a garantir a segurança microbiológica, principalmente de queijos artesanais brasileiros.

Essa abordagem também pode ser utilizada como um meio rápido de indicar a ausência de tratamento térmico no leite em queijos que devem ser produzidos com leite cru para cumprir regulamentos específicos de identidade e qualidade.

Além disso, a utilização de coordenadas de cor do sistema CIELAB na quantificação da atividade enzimática, nunca antes descrito na literatura, pode abrir portas para novos estudos que usem estes na quantificação de outros compostos cromogênicos.