

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
MESTRADO ACADÊMICO EM INOVAÇÃO**

**Maria Eduarda Martins Vieira**

**Uso de proteínas do soro do leite microparticuladas na fabricação de requeijão cremoso**

**Juiz de Fora**

**2024**

**Maria Eduarda Martins Vieira**

**Uso de proteínas do soro do leite microparticuladas na fabricação de requeijão cremoso**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

**Juiz de Fora**

**2024**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca  
Universitária da UFJF,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vieria, Maria Eduarda Martins .

Uso de proteínas do soro do leite microparticuladas na fabricação de  
requeijão cremoso / Maria Eduarda Martins Vieria. -  
-2024.

54 f. : il.

Orientador: Rodrigo Stephani

Coorientador: Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal  
de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-  
Graduação em Química, 2024.

1. Requeijão. 2. Proteínas séricas. 3. Microparticulação.  
4. Caseína. I. Stephani, Rodrigo , orient. II. Oliveira, Luiz  
Fernando Cappa de, coorient. III. Título.

**Maria Eduarda Martins Vieira**

**Uso de proteínas do soro do leite microparticuladas na fabricação de requeijão cremoso**

Dissertação  
apresentada ao  
Programa de Pós-  
Graduação em  
Química  
da Universidade Federal  
de Juiz de Fora como  
requisito parcial à obtenção  
do título de Mestre em  
Química. Área de  
concentração: Química.

Aprovada em 30 de setembro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Rodrigo Stephani** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira** - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Patricia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá**  
Instituto de Tecnologia de Alimentos

**Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Juiz de Fora, 09/09/2024.**



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Stephani, Professor(a), em 30/09/2024, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Professor(a), em 30/09/2024, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá, Usuário Externo, em 01/10/2024, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por Antonio Carlos Sant Ana, Professor(a), em 01/10/2024, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj ([www2.uffj.br/SEI](http://www2.uffj.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1975357 e o código CRC 4E3916FF.

---

Dedico este trabalho ao meu avô, tios e amigos que estiveram presentes em todos os momentos de estresse e felicidade durante a escrita deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus tios, que diante de tantas adversidades sempre me apoiaram e me incentivaram a buscar os melhores resultados em meio à tantos momentos turbulentos. Agradeço pelas broncas, que me fizeram evoluir e aos momentos de bobagens que me fizeram sorrir. Ao meu avô, mesmo que de longe, agradeço a educação que me foi proporcionada, às gargalhadas bem dadas e a chance de saber o que é ser feliz e amada.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Stephani que me auxiliou e demonstrou confiança no meu trabalho. Aos meus amigos de laboratório por sempre estarem dispostos a me ajudar, seja no âmbito pessoal ou acadêmico, e por me aguentarem nos momentos mais estressantes desse mestrado. Em especial agradeço a minha ITI e amiga Kamilla Sousa, por fazer com que esse projeto fosse capaz de ser finalizado de maneira tão rápida e bem feita. Agradeço ao meu amigo Heitor Bade, que me aguenta desde criança, e que sem seu apoio em momentos críticos os obstáculos seriam difíceis de ultrapassar. E agradeço a Natália Alves, Nathalia Campos (Fields) e Taynan Barroso que sempre estiveram disponíveis para me ajudarem a entender problemas no projeto e tentar solucioná-los, além de fazer meus dias muito mais divertidos, felizes e leves para serem vividos.

Agradeço a pessoas que passaram, as que ficaram e algumas que chegaram durante o processo, e que foram imprescindíveis para o dia de hoje acontecer. Em especial agradeço a Beatriz Rezende, Lais Valle, Leandro Ávila, Rafael de Oliveira e Vitor Correa.

Agradeço ao CNPq, FAPEMIG, CAPES, Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora e aos professores que se dedicaram a passar um pouco do seu conhecimento. Aos professores Alexandre Cuin, Luiz Antônio Sodré, Luiz Fernando Cappa, Maribel Navarro e Rosana Colombara deixo meu muito obrigada por serem professores e pessoas incríveis.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar o efeito da substituição em 0%, 25%, 50%, 75% e 100% (T1 a T5) da massa enzimática por proteína do soro do leite microparticulada em formulações de Requeijão, visando manter os parâmetros de umidade ( $60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), gordura no extrato seco ( $57,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e pH (5,4-5,7) similares para todos os produtos finais. O delineamento dos experimentos foi iniciado pela produção das proteínas microparticuladas do soro do leite (MWP), seguida da formulação dos cinco diferentes tratamentos de Requeijão (T1 a T5, 0% a 100% de substituição da massa enzimática) e as análises de composição, reologia, coloração, espectroscopia e textura dos produtos. A partir dos atributos avaliados, foram observadas mudanças principalmente associadas à coloração, viscosidade, capacidade de derretimento e textura. Destaca-se a partir das análises colorimétricas que as formulações que continham maior conteúdo de microparticulado (T5) se tornaram mais avermelhadas ( $a^* 0,89 \pm 0,22$ ) e amareladas ( $b^* 20,03 \pm 0,22$ ), além de uma diminuição na luminosidade ( $L^* 79,52 \pm 0,39$ ) refletindo um aumento no *Browning Index* - BI ( $29,19 \pm 0,49$ ) atribuído à reação de Maillard entre os carboidratos e as proteínas presentes no produto. Uma menor capacidade de derretimento ( $108,57 \pm 1,29$ ) e índice de elasticidade ( $0,58 \pm 0,01$ ) foram observadas em amostras com maior teor de MWP em decorrência da diminuição de interação caseína-caseína no meio, tornando as formulações mais fluidas e menos elásticas. Na análise de textura, notou-se também que a adição de MWP aumentou os atributos de dureza e gomosidade do produto final. Análises reológicas demonstraram que a viscosidade diminuiu com o aumento da substituição da massa até 75%, T4 ( $1,42 \pm 0,05 \text{ Pa.s}$ ), mas apresentou aumento na formulação com 100% de substituição, T5 ( $3,93 \pm 0,23 \text{ Pa.s}$ ). Essas mudanças podem estar associadas a substituição da caseína pela proteína do soro do leite microparticuladas, tornando T5 um produto com características de emulsificação muito específicas quando comparadas às demais formulações que ainda possuem certa concentração de caseína oriundas da massa enzimática.

Palavras-chave: Requeijão; proteínas séricas; microparticulação; caseína.



## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of substituting 0%, 25%, 50%, 75%, and 100% (T1 to T5) of the enzymatic cheese curd with microparticulated whey protein (MWP) in Requeijão (spreadable processed cheese) formulations, with the objective of maintaining similar moisture ( $60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), fat in dry extract ( $57.5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), and pH (5.4-5.7) parameters to all final products. The experimental design was started with the production of microparticulated whey protein (MWP), followed by the formulation of five different Requeijão treatments (T1 to T5, 0% to 100% substitution of enzymatic cheese curd), and the analyses of composition, rheology, color, spectroscopy, and texture of the products. Based on the evaluated attributes, changes were primarily associated with color, viscosity, melting degree, and texture. Colorimetric analyses highlighted those formulations with higher MWP content (T5) became reddish ( $a^* 0.89 \pm 0.22$ ) and yellowish ( $b^* 20.03 \pm 0.22$ ), along with a decrease in luminosity ( $L^* 79.52 \pm 0.39$ ), reflecting an increase in the Browning Index (BI) ( $29.19 \pm 0.49$ ), ascribed to Maillard reactions between carbohydrates and proteins present in this product. A lower melting degree ( $108.57 \pm 1.29$ ) and elasticity index ( $0.58 \pm 0.01$ ) were observed in samples with higher MWP content due to the reduced casein-casein interactions, making the formulations more fluid and less elastic. In the texture analysis, it was also noted that the addition of MWP increases the hardness and gumminess attributes of the final product. Rheological analyses demonstrated that viscosity decreased with increasing up to 75% enzymatic cheese curd substitution, T4 ( $1.42 \pm 0.05 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ) but increased in the formulation with 100% substitution, T5 ( $3.93 \pm 0.23 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ). These changes may be associated with the replacement of casein by MWP, resulting in T5 being a product with very specific emulsifying features compared to the other formulations, which still contain some concentration of casein derived from the enzymatic cheese curd.

Keywords: *Requeijão* (spreadable processed cheese); whey proteins; microparticulation; casein.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Representação da micela de caseína .....   | 12 |
| <b>Figura 2</b> - Representação das interações e agregação entre estruturas primárias, secundárias e terciárias da $\beta$ -LG e demais soroproteínas decorrente do aumento de temperatura ..... | 14 |
| <b>Figura 3</b> - Esquema da microparticulação das proteínas do soro do leite .....  | 20 |
| <b>Figura 4</b> - Porcentagem relativa das diferentes formulações de Requeijão com e sem adição de proteína microparticulada de soro de leite .....  | 22 |
| <b>Figura 5</b> - Fluxograma da produção de Requeijões sem adição de MWP (T1) .....  | 23 |
| <b>Figura 6</b> - Fluxograma da produção de Requeijões com a substituição de Muçarela por MWP (T2, T3 e T4) .....  | 24 |
| <b>Figura 7</b> - Fluxograma da produção de Requeijões com a substituição de Muçarela MWP (T5) .....   | 25 |
| <b>Figura 8</b> - Cromatogramas dos padrões de $\alpha$ -LA e $\beta$ -LG .....  | 26 |
| <b>Figura 9</b> - Espectro na região do Infravermelho de WPC e MWP .....   | 31 |
| <b>Figura 10</b> - Distribuição do tamanho de partícula antes e após o tratamento de microparticulação .....   | 32 |
| <b>Figura 11</b> - Fotografia das diferentes formulações de Requeijão .....  | 36 |
| <b>Figura 12</b> - Fotografia antes e após o forneamento das diferentes formulações de Requeijão .....   | 39 |
| <b>Figura 13</b> - Viscosidade aparente (Pa.s) das formulações baseada na taxa de cisalhamento de $0,1 \text{ s}^{-1}$ a $100 \text{ s}^{-1}$ .....  | 41 |
| <b>Figura 14</b> Representação da formação de gel com mínima concentração de caseína após a substituição da massa enzimática por MWP .....   | 43 |
| <b>Figura 15</b> - Espectros Raman das diferentes formulações de Requeijão produzidas .....  | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Composição proteica do soro de leite bovino .....  | 13 |
| <b>Tabela 2</b> - Requisitos físico-químicos para os diferentes tipos de Requeijões .....  | 16 |
| <b>Tabela 3</b> - Composição das diferentes formulações de Requeijão com e sem substituição de Muçarela por proteína microparticulada de soro de leite ..... | 21 |
| <b>Tabela 4</b> - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação das frações proteicas $\alpha$ -LA e $\beta$ -LG. ....                                | 26 |
| <b>Tabela 5</b> - Porcentagem de desnaturação, por HPLC, de betalactoglobulina e alfalactoalbumina antes e após o tratamento de microparticulação .....      | 31 |
| <b>Tabela 6</b> - Caracterizações das diferentes formulações de Requeijão .....  | 33 |
| <b>Tabela 7</b> - Resíduo mineral fixo das formulações de Requeijão .....  | 34 |
| <b>Tabela 8</b> - Resultados dos parâmetros de cor e índice de escurecimento das diferentes formulações de Requeijão.....                                    | 35 |
| <b>Tabela 9</b> - Medição da consistência das formulações de Requeijão (T1 a T5) por distância percorrida em 30 segundos .....                               | 37 |
| <b>Tabela 10</b> - Medição da capacidade de derretimento das formulações de Requeijão (T1 a T5) .....  | 38 |
| <b>Tabela 11</b> - Avaliação de textura das diferentes formulações de Requeijão .....  | 39 |
| <b>Tabela 12</b> - Avaliação reológica das diferentes formulações de Requeijão.....  | 40 |

## SUMÁRIO

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1      | PROTEÍNAS DO LEITE.....  | 11        |
| 1.1.1    | Caseínas.....  | 11        |
| 1.1.2    | Soroproteínas.....   | 13        |
| 1.1.3    | Proteínas do soro do leite microparticuladas .....                           | 15        |
| 1.2      | REQUEIJÃO .....  | 15        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>18</b> |
| 2.1      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 18        |
| <b>3</b> | <b>METODOLOGIA.....</b>  | <b>19</b> |
| 3.1      | MICROPARTICULAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE .....                       | 19        |
| 3.2      | FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO .....   | 20        |
| 3.2.1    | Elaboração das formulações .....   | 22        |
| 3.3      | CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO<br>INFRAVERMELHO .....        | 25        |
| 3.4      | AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA .....                      | 25        |
| 3.5      | CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA<br>PERFORMANCE (HPLC) ..... | 26        |
| 3.6      | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....   | 27        |
| 3.7      | AVALIAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO .....                                      | 28        |
| 3.8      | AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DAS FORMULAÇÕES.....                               | 28        |
| 3.9      | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DERRETIMENTO.....                                 | 28        |
| 3.10     | AVALIAÇÃO DE TEXTURA.....  | 29        |
| 3.11     | AVALIAÇÃO REOLÓGICA.....   | 29        |
| 3.12     | CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN .....                                | 29        |
| 3.13     | ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....   | 30        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>31</b> |
|          | <b>SUMÁRIO</b> .....  |           |
| 4.1      | CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAL E DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS DE WPC E MWP ..... | 31        |
| 4.2      | ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO .....                           | 33        |
| 4.3      | AVALIAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO .....   | 35        |
| 4.4      | ANÁLISE COLORIMÉTRICA DAS FORMULAÇÕES .....   | 36        |
| 4.5      | AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DAS FORMULAÇÕES .....                                       | 38        |
| 4.6      | AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DERRETIMENTO .....   | 39        |
| 4.7      | AVALIAÇÃO DE TEXTURA .....  | 41        |
| 4.8      | AVALIAÇÃO REOLÓGICA .....   | 42        |
| 4.9      | CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN .....   | 44        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | <b>46</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>47</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O leite de vaca destaca-se como o mais consumido na dieta humana, notabilizando-se pela sua acessibilidade e riqueza nutricional, possuindo macro e micronutrientes responsáveis pelo desenvolvimento humano, incluindo cálcio, proteínas, lipídios e vitaminas lipossolúveis (Antunes et al., 2023; MacDonald et al., 2005). As proteínas encontradas no leite são consideradas de alto valor nutricional por possuírem aminoácidos essenciais e promoverem a biossíntese de aminoácidos não essenciais. As caseínas e as soroproteínas do leite desempenham funções vitais tanto em processos biológicos quanto na produção de alimentos (Goulding et al., 2020; Smithers, 2008; Madureira et al., 2010).

Um dos derivados populares do leite é o Requeijão, um produto lácteo cremoso e suave que ganha grande apreço por sua versatilidade na gastronomia. Produzido através da coagulação enzimática ou ácida do leite (levando à separação das caseínas e subsequente eliminação do soro) o Requeijão apresenta-se com um sabor ligeiramente ácido, massa homogênea com uma cremosidade típica, tornando-se um produto para a preparação de uma variedade de receitas, de sobremesas a pratos salgados (Rapacci, 1997).

### 1.1 PROTEÍNAS DO LEITE

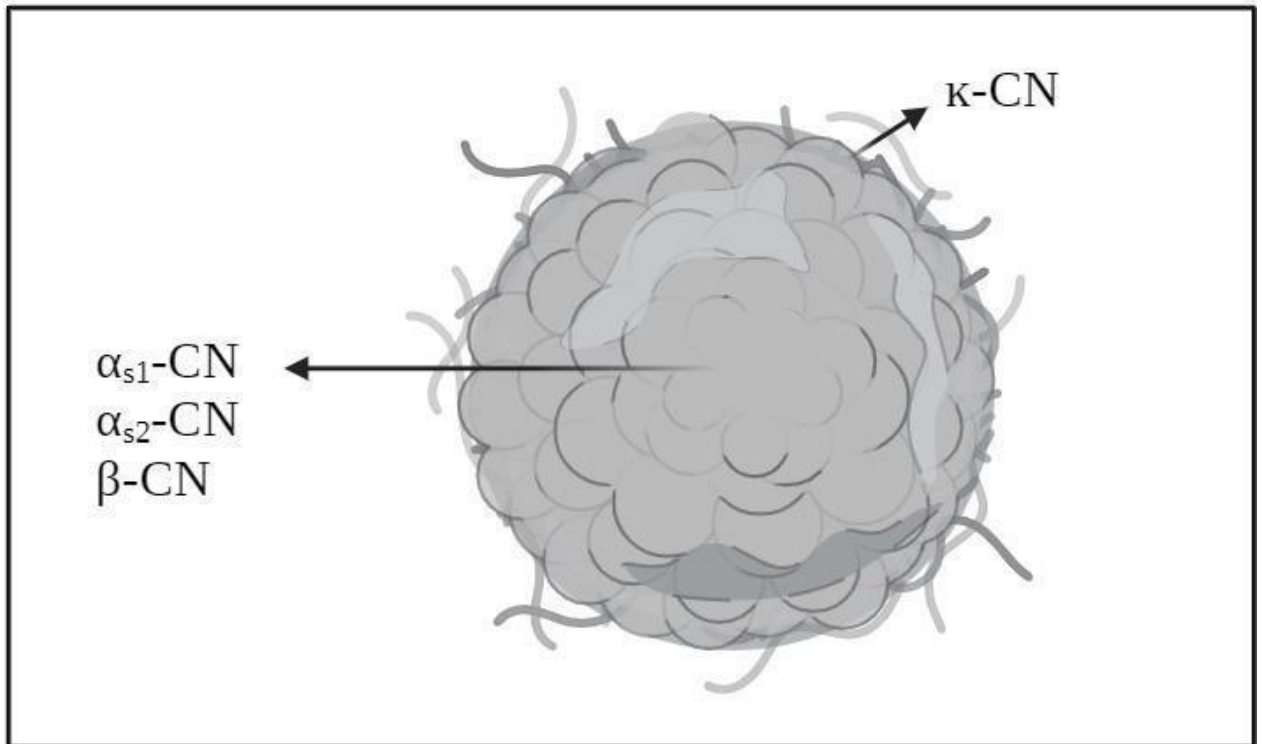
As proteínas, essenciais entre os três macronutrientes vitais para os seres vivos, desempenham papéis biológicos importantes no organismo, e estão envolvidas na interação com minerais, incluindo cálcio, magnésio e ferro. Essas interações são a chave para inúmeras funções corporais, destacando a importância das proteínas na manutenção da saúde e no funcionamento adequado do organismo (Gaucheron, 2011; Javed et al., 2022).

#### 1.1.1 Caseínas

Os dois principais grupos de proteínas do leite são as caseínas (CN) e as proteínas do soro do leite. As caseínas constituem a maior parte das proteínas presentes no leite bovino, correspondendo a aproximadamente 80% do total de proteínas encontradas. Essas proteínas são caracterizadas por seu grupamento fosfato e por possuírem uma estrutura aberta e flexível (Silva et al., 2019). A flexibilidade das proteínas com outros componentes permite interação com outros elementos na matriz láctea (como cálcio e fosfato), além da formação de micelas (Figura

1) que são responsáveis pela estabilidade térmica do leite (Fox & Brodtkorb, 2008).

**Figura 1** - Representação da micela de caseína.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As caseínas podem ser divididas em quatro frações principais, as caseínas  $\alpha_{s1}$  e  $\alpha_{s2}$ , que formam o conjunto mais numeroso entre as caseínas e são ricas em resíduos de fosfoferina, o que facilita a ligação com íons de cálcio e a formação de complexos cálcio-caseína. A  $\beta$ -caseína que possui um alto teor de grupamento fosfato e uma conformação flexível, além de desempenhar um papel importante na estabilização das micelas de caseína. E a  $\kappa$ -caseína, uma glicoproteína fundamental para a estabilidade micelar por meio de sua região hidrofílica, que se estende para fora da micela, impedindo a agregação excessiva e a coagulação das micelas que pode ser causada por mudanças de temperatura e diminuição do pH, por exemplo. (Goulding et al., 2020; Grappin et al., 2002; Silva et al., 2019).

O tamanho das micelas de caseína varia entre 100 e 300 nm e são determinados pela quantidade de  $\kappa$ -caseína disponível. A  $\kappa$ -caseína promove a estabilização da superfície da micela fazendo com que ocorra o impedimento do seu crescimento por agregação, assim, quanto maior a quantidade de  $\kappa$ -caseína presente, maior a quantidade de micelas que podem ser estabilizadas com menor diâmetro (Dalglish; Corredig, 2012).

A estabilidade das micelas de caseína é influenciada principalmente pela temperatura e pelo pH do meio. Observa-se que, com o aumento da temperatura, ocorrem mudanças na estrutura e na solubilidade de alguns componentes na micela, aumentando assim a quantidade de fosfato de cálcio associado a elas. Esse fenômeno leva à dissociação da  $\kappa$ -caseína, resultando em uma redução da estabilidade. Quando o pH diminui para valores abaixo de 6,2, o cálcio iônico tem uma tendência a interagir mais fortemente com as caseínas o que pode levar à precipitação. Além disso, quando ocorre a redução no pH as cargas das proteínas também são afetadas, essas são responsáveis por manterem as micelas repelidas umas das outras. Sendo assim, quando o pH diminui a repulsão também é atenuada e, conseqüentemente, a estabilidade (Fox & McSweeney, 2003; O'Connell et al., 2006).

### 1.1.2 Soroproteínas

A qualidade nutricional das soroproteínas é baseada na composição de aminoácidos presentes, assim, são classificadas como sendo de alto valor biológico por apresentarem alta concentração de aminoácidos essenciais (Devrieis; Phillips, 2015). O perfil proteico do soro é uma complexa combinação que inclui moléculas como a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA), Imunoglobulinas (IgG), Albumina do Soro Bovino (BSA) e lactoferrina (LF) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição proteica do soro de leite bovino.

| Proteína                               | Leite Bovino (g.L <sup>-1</sup> ) |
|--|-----------------------------------|
| $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) | 3,2                               |
| $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA) | 1,2                               |
| Imunoglobulinas (IgG)                  | 0,8                               |
| Albumina do soro bovino (BSA)          | 0,4                               |
| Lactoferrina (LF)                      | 0,2                               |

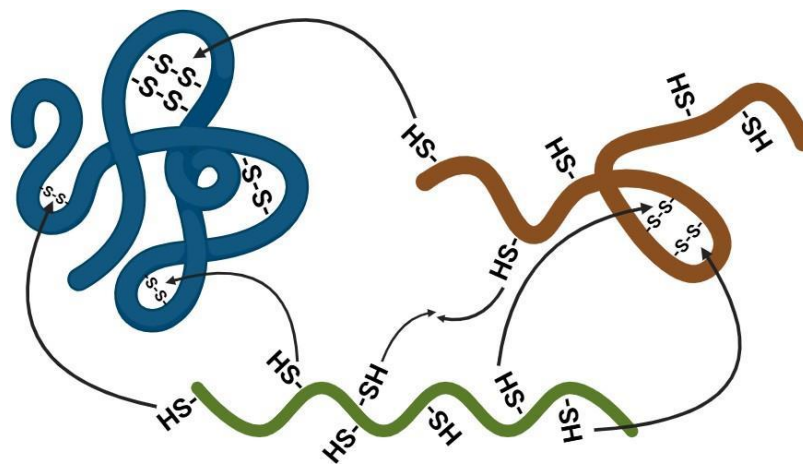
Fonte: Adaptado de Onwulata, 2008.

A  $\beta$ -LG, uma proteína globular, é a mais abundante, compondo mais de 50% das proteínas totais encontradas no soro de leite. A estrutura em que essa proteína irá se encontrar é, diretamente, dependente do pH e da temperatura do meio. Em condições fisiológicas normais, quando o pH está acima do ponto isoelétrico da  $\beta$ -LG (pH = 5,4), resultando em uma carga



líquida superficial igual a zero, a  $\beta$ -LG se encontra na forma de um dímero. Quando o pH está abaixo de 3,5 e acima de 7,5 ocorre a dissociação dos dímeros em monômeros, fazendo com que a  $\beta$ -LG se apresente em unidades individuais. Já em pH entre 3,5 e 5,2 a  $\beta$ -LG sofre uma tendência à polimerização, formando uma estrutura com oito unidades de proteína. Em condições de temperatura ambiente, a  $\beta$ -LG coexiste entre suas formas de dímeros e monômeros. Contudo, quando a temperatura excede 40 °C e o pH se encontra entre 6 e 9 ocorre a dissociação dos dímeros da  $\beta$ -LG em monômeros. Além disso, ao ser exposta a temperaturas superiores a 70 °C, a desnaturação da  $\beta$ -LG passa a ser influenciada pelo tempo submetida a essas condições de alta temperatura, perdendo sua estrutura nativa secundária e terciária. O aumento de temperatura no meio promove a exposição de grupos tióis (-SH), localizados no núcleo hidrofóbico da proteína em seu estado nativo, esses grupos interagem com as pontes de dissulfeto presentes nas soroproteínas, como ilustrado na Figura 2, promovendo assim a agregação dessas (Onwulata et al., 2008; Petit et al., 2011; Poppi et al., 2015; Sousa, 2019).

**Figura 2** - Representação das interações e agregação entre estruturas primárias, secundárias e terciárias da  $\beta$ -LG e demais soroproteínas decorrente do aumento de temperatura.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A  $\alpha$ -LA, uma proteína globular, constitui aproximadamente 15 % m/m das proteínas totais do soro e desempenha um papel crucial na biossíntese da produção de lactose (Haraguchi et al., 2006; Pérez, 1995; Poppi et al., 2015). Uma propriedade da  $\alpha$ -LA é sua capacidade de se ligar ao cálcio, conferindo-lhe uma estabilidade térmica superior. Entretanto, essa proteína se desnatura quando submetida a condições de pH 6,7 e temperatura de 65,2 °C, processo esse

atribuído à liberação de íons de  $\text{Ca}^{2+}$ , contudo, sua característica de alta estabilidade térmica permite que essa desnaturação seja reversível através do resfriamento (Poppi et al., 2015; Silva, 2017).

Assim, pode-se dizer que o processo de desnaturação e agregação das proteínas do soro ocorrem em duas fases distintas. A primeira fase é a desnaturação da estrutura nativa da proteína, caracterizado pela dissociação de ligações intermoleculares. Enquanto a segunda fase consiste no rearranjo estrutural que levará à agregação proteica quando submetidas a temperaturas que excedam 70 °C (Silva, 2017).

### **1.1.3 Proteínas do soro do leite microparticuladas**

O processo de microparticulação envolve a desnaturação, agregação e controle do tamanho das proteínas globulares do soro de leite, por meio de tratamento térmico, cisalhamento e mudança no pH, potencializando assim, certas funções que são aproveitadas no ramo alimentício. Em sua forma nativa as proteínas do soro do leite existem como proteínas globulares. O início do processo de microparticulação se dá com a desestruturação parcial das estruturas proteicas, resultando em um estado intermediário, tal estado expõe regiões hidrofóbicas da proteína, diminuindo sua solubilidade e promovendo a formação de agregados com outras moléculas proteicas. As proteínas do soro de leite microparticuladas demonstram uma estabilidade térmica aprimorada devido a pouca quantidade de sítios ativos disponíveis para que ocorra uma agregação, além de funcionalidades distintas em comparação com as proteínas em sua forma nativa (Chung et al., 2014; Homer et al., 2021; Çakır-Fuller, 2015).

Algumas características como forma e consistência desses agregados têm um impacto direto na percepção sensorial quando consumidos, como seu tamanho, que pode ser comparável ao glóbulo de gordura (10  $\mu\text{m}$ ) influenciando na sua aplicabilidade. Essa técnica é frequentemente usada na indústria de alimentos para melhorar as propriedades funcionais das proteínas, tornando-as mais eficazes em aplicações culinárias e na formulação de produtos como substituto parcial de gordura em sorvete, iogurte e queijos processados (Dissanayake & Vasiljevic, 2009; Homer et al., 2021; Ipsen, 2017; Lee et al., 1992).

## **1.2 REQUEIJÃO**

O Requeijão é um dos produtos mais tradicionalmente consumidos nos lares nacionais.

Apenas o fato de ser um queijo processado, tipicamente, brasileiro (Oliveira et al., 2016) é insuficiente para justificar o seu grande consumo entre a população. Uma pesquisa feita pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) mostrou que do ano de 2017 para o de 2022 houve um crescimento de 15% na produção de Requeijão chegando na marca de 380 mil toneladas (Tetra Pak, 2023). Um dos motivos que ajuda a entender o porquê do seu alto consumo pelos brasileiros é o fato de ser consumido (direta ou indiretamente) em diversos horários ao longo do dia (Zacarchenco et al., 2012). Alguns dos atributos que devem estar presentes no Requeijão são, odor e cor característicos, consistência fatiável ou untável, textura cremosa, fina, lisa ou compacta e sabor levemente ácido (Van Dender, 2014). De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária, a partir dos teores de gordura e umidade que o Requeijão apresente, ele pode ser classificado como Requeijão, Requeijão Culinário e Requeijão de Manteiga (Tabela 1) (Brasil, 1997).

**Tabela 2.** Requisitos físico-químicos para os diferentes tipos de Requeijões.

| <b>Tipos/ Requisitos</b>                                  | <b>Requeijão</b> | <b>Requeijão Cremoso</b> | <b>Requeijão de Manteiga</b> |
|---|------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>Matéria gorda no extrato seco g.100 g<sup>-1</sup></b> | 45,0 a 54,9      | 55,0                     | 25,0 a 59,9                  |
| <b>Umidade g.100 g<sup>-1</sup></b>                       | Máx. 60,0        | 65,0                     | 58,0                         |

Fonte: Adaptado de Brasil, 1997.

As etapas fundamentais na fabricação do Requeijão começam com a obtenção da massa que serve de base para o produto. Posteriormente, há a adição de sal fundente, junto com o controle de temperatura, que contribui para a consistência desejada do Requeijão. A gordura é adicionada para enriquecer o sabor, além de modificar a textura e, por fim, a água é incorporada para ajustar a umidade e completar o processo de fabricação (Van Dender, 2014).

Os sais fundentes utilizados apresentam um papel fundamental para a produção de queijos processados, como o Requeijão, contribuindo para a textura e o sabor do produto, os principais sais utilizados são o citrato de sódio e o fosfato de sódio (Lucey et al., 2011). Além de contribuir com os aspectos sensoriais, os sais possuem a função de remover o cálcio do sistema proteico, solubilizar a proteína, hidratar, estabilizar o pH e ajudar na reestruturação das proteínas durante o processo de resfriamento (Van Dender, 2014). A atuação dos sais se dá pela interação deles com a matriz proteica, fazendo com que ocorra a quebra das ligações de fosfato

de cálcio que interligam as moléculas de para-caseína, substituindo o cálcio pelo sódio resultando em caseína solúvel e formando uma estrutura proteica ocasionando o aumento de viscosidade do produto (Deshwal et al., 2023; Mozuraityte et al., 2019).

O nosso atual grupo de pesquisa já vem desenvolvendo trabalhos na área de leite e derivados, destacando a pesquisa em que se analisou Requeijões de diferentes marcas disponíveis no mercado por espectroscopia Raman (De Sá Oliveira, 2016). Assim, o presente trabalho possui um histórico dentro do grupo e tem como finalidade a reutilização de soro de leite para a produção de micropartículas de proteína e sua utilização em uma das matrizes mais consumidas no mercado nacional, o Requeijão, visando manter quesitos sensoriais e legislativos.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi analisar a influência da substituição da massa enzimática por proteínas do soro de leite microparticuladas (MWP) nas características físico-químicas e microestruturais do Requeijão.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produção das proteínas microparticuladas visando sua utilização nos Requeijões produzidos;
- b) Produção de cinco formulações de Requeijão, com substituição de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% (T1-T5) da massa enzimática por proteína microparticulada do soro do leite;
- c) Caracterização do perfil espectral na região do infravermelho do soro de proteína microparticuladas;
- d) Caracterização das frações proteicas das proteínas microparticuladas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) e por distribuição do tamanho de partícula;
- e) Avaliação da composição físico-química dos Requeijões;
- f) Avaliação da coloração dos Requeijões;
- g) Avaliação do perfil de consistência, textura e reológica dos Requeijões;
- h) Caracterização do perfil espectral Raman dos Requeijões.

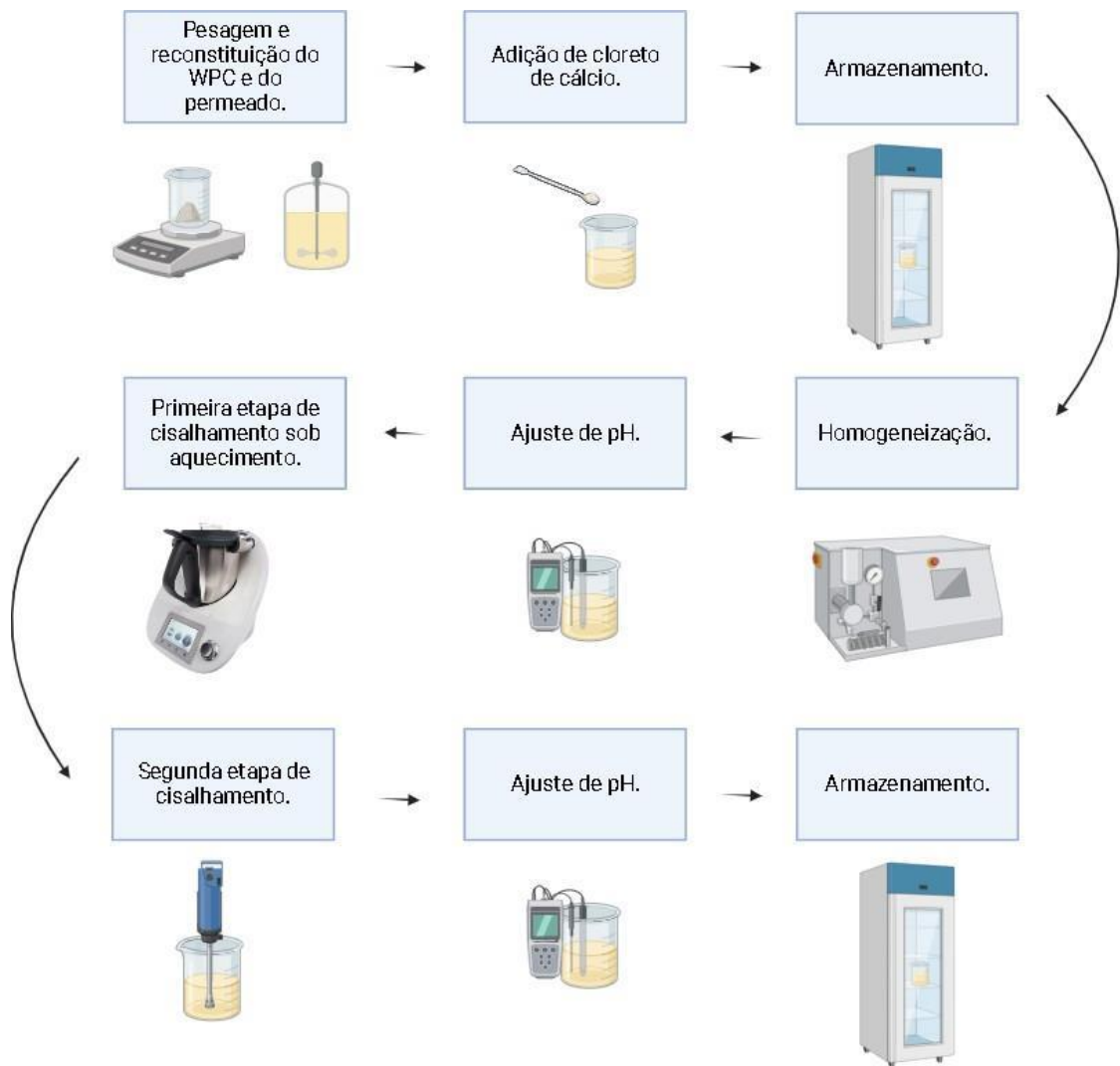
### 3 METODOLOGIA

A metodologia proposta para a microparticulação das proteínas do soro do leite e a formulação dos Requeijões será detalhada a seguir. Essa inclui análises realizadas nos produtos, abrangendo medições de pH, cálcio iônico, gordura, umidade, proteína total bem como caracterizações através de espectroscopia Raman e na região do infravermelho, colorimetria, textura, consistência e reologia.

#### 3.1 MICROPARTICULAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

WPC80 (*Whey Protein Concentrate* 80 g.100 g<sup>-1</sup> de proteína) e permeado de soro de leite em pó foram reconstituídos em água sob agitação visando obter 10 g.100 g<sup>-1</sup> de proteína e 20 g.100 g<sup>-1</sup> de sólidos totais. Em seguida foi realizada a adição de solução de cloreto de cálcio 40 g.100 mL<sup>-1</sup>. Foi feito o armazenamento da mistura por 24 horas e após o tempo proposto, o produto foi homogeneizado sem utilização de pressão, e seu pH ajustado. Posteriormente, fez-se a primeira etapa de cisalhamento sob aquecimento, logo em seguida a segunda etapa de cisalhamento foi aplicada, mas sem a aplicação de aquecimento. Por fim, o pH foi ajustado de acordo com a matriz em que o microparticulado foi utilizado (Figura 2). Foi nomeado WPC a solução de WPC80 com permeado e MWP a solução após sofrer o processo de microparticulação.

**Figura 3** - Esquema da microparticulação das proteínas do soro do leite.



Fonte: Criado com Biorender.com (2023).

### 3.2 FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO

Neste estudo, desenvolveram-se cinco formulações para a produção de Requeijão, identificadas como T1, T2, T3, T4 e T5 (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de substituição de massa enzimática). Para o cálculo das quantidades dos ingredientes utilizou-se balanço de massa, mantendo constantes três parâmetros: umidade, gordura e, conseqüentemente gordura no extrato seco (GES). Definiu-se como meta para todas as cinco formulações atingir o nível de umidade de  $60 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , teor de gordura de  $23 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  e gordura no extrato seco de  $57,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . A formulação T1, que não continha proteína do soro de leite microparticulada (0%), foi definida como sendo a formulação controle. As formulações T2, T3 e T4 tiveram 25%, 50% e 75% de massa

enzimática retirada do seu preparo, respectivamente, e substituída por MWP. Como a massa enzimática e o soro microparticulado não possuem as mesmas composições, para os parâmetros de umidade, gordura e GES se manterem constantes como o desejado, foram feitos reajustes nas quantidades adicionadas de água e manteiga. Para a formulação T5 toda a massa enzimática foi retirada do preparo e substituída por proteína do soro microparticulada. Na Tabela 3 é descrito a composição das diferentes formulações produzidas. A seleção dos ingredientes foi feita após uma série de experimentações preliminares voltadas para a elaboração do Requeijão.

- a) T1- Requeijão cremoso (formulação controle);
- b) T2- Requeijão cremoso com 25% de substituição de massa enzimática por MWP;
- c) T3- Requeijão cremoso com 50% de substituição de massa enzimática por MWP;
- d) T4- Requeijão cremoso com 75% de substituição de massa enzimática por MWP;
- e) T5- Requeijão cremoso com 100% de substituição de massa enzimática por MWP.

**Tabela 3.** Composição das diferentes formulações de Requeijão com e sem substituição de massa enzimática por MWP.

| <b>Ingredientes (g.100 g<sup>-1</sup>)</b> | <b>T1</b> | <b>T2</b> | <b>T3</b> | <b>T4</b> | <b>T5</b> |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Massa enzimática</b>                    | 47,3      | 35,5      | 23,6      | 12,0      | 0,0       |
| <b>Manteiga</b>                            | 12,3      | 15,9      | 19,5      | 23,1      | 26,7      |
| <b>Citrato</b>                             | 2,0       | 2,0       | 2,0       | 2,0       | 2,0       |
| <b>Cloreto de sódio</b>                    | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| <b>Água</b>                                | 37,9      | 28,4      | 19,0      | 9,3       | 0,0       |
| <b>MWP*</b>                                | 0,0       | 17,7      | 35,4      | 53,1      | 70,8      |
| <b>Total</b>                               | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       |

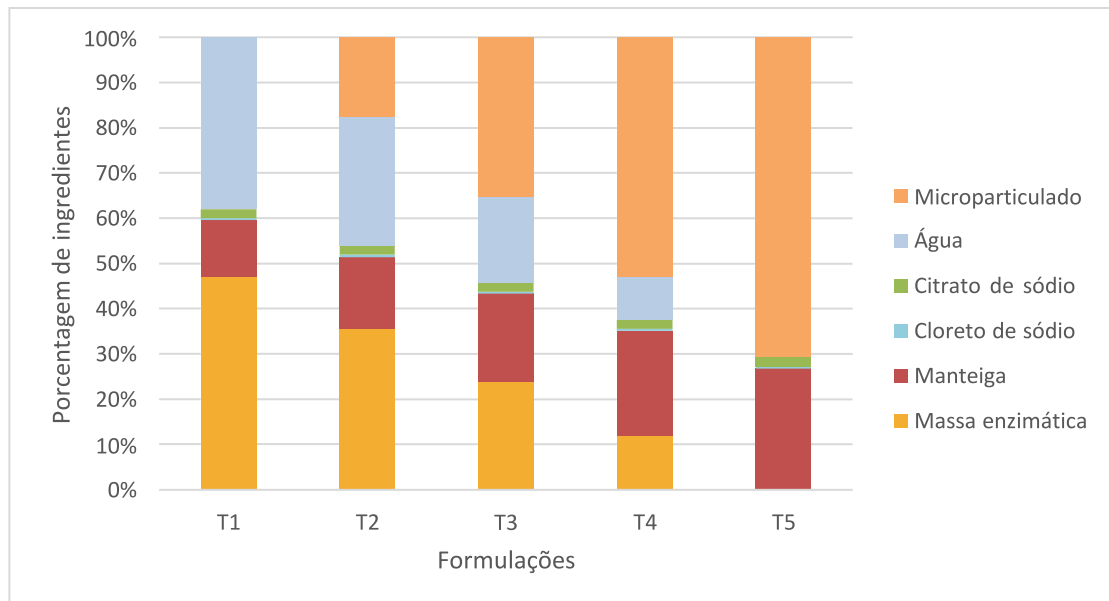
T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\*MWP: Proteína Microparticulada do Soro.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).



**Figura 4 -** Porcentagem relativa das diferentes formulações de Requeijão com e sem adição MWP.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

### 3.2.1 Elaboração das formulações

O aparelho empregado na elaboração das formulações de Requeijão foi um simulador de processos TM5-4 (marca: Vorwek), e o processo seguiu as etapas descritas abaixo.

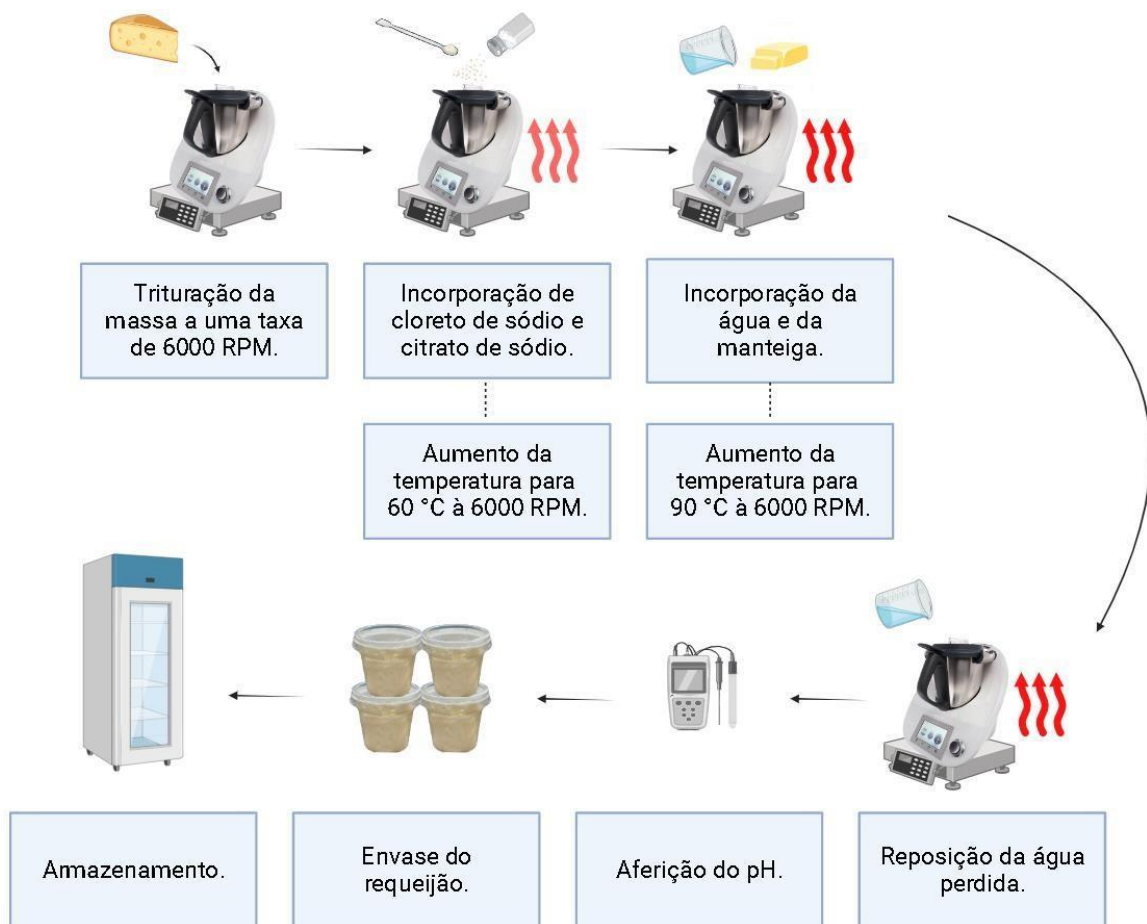
Anteriormente à produção, foram conduzidas análises para determinar os teores de umidade na estufa por gravimetria (marca: DeLeo) e gordura por método de Gerber nos ingredientes a serem empregados, incluindo a massa enzimática e a manteiga. Os resultados obtidos foram inseridos em uma tabela de balanço de massa para calcular a quantidade precisa de cada componente, visando atingir as especificações previamente definidas para o produto final.

A massa enzimática selecionada foi previamente triturada com o auxílio do simulador de processos com rotação de 6000 rpm e pesada para inclusão nas formulações correspondentes (T1, T2, T3 e T4). As proporções foram estabelecidas de acordo com os requisitos legais, visando obter 23 g.100 g<sup>-1</sup> de gordura e 60 g.100 g<sup>-1</sup> de umidade. Subsequentemente, incorporou-se o citrato de sódio para tornar a massa mais homogênea e cremosa, provocando uma mudança na textura do produto final. Além da adição do cloreto de sódio ajustou-se a temperatura para 60 °C e a rotação para 6000 rpm durante um período de 3 minutos. Posteriormente, os componentes remanescentes foram integrados à formulação, o peso do simulador de processos foi verificado e a temperatura elevada para 90 °C, mantendo-se por 15 minutos. Para as formulações T2, T3 e T4, que incluem proteína microparticulada, essa foi adicionada juntamente com a manteiga e a água. No caso da

formulação T5 não houve adição de água. Nos cinco últimos minutos de produção, repôs-se a água perdida por evaporação durante o processo e no minuto final, o pH foi aferido, sendo ajustado com ácido cítrico  $80 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  ou hidróxido de sódio a  $50 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , conforme necessário, até alcançar uma faixa de pH entre 5,4 e 5,7 (Figuras 5–7).

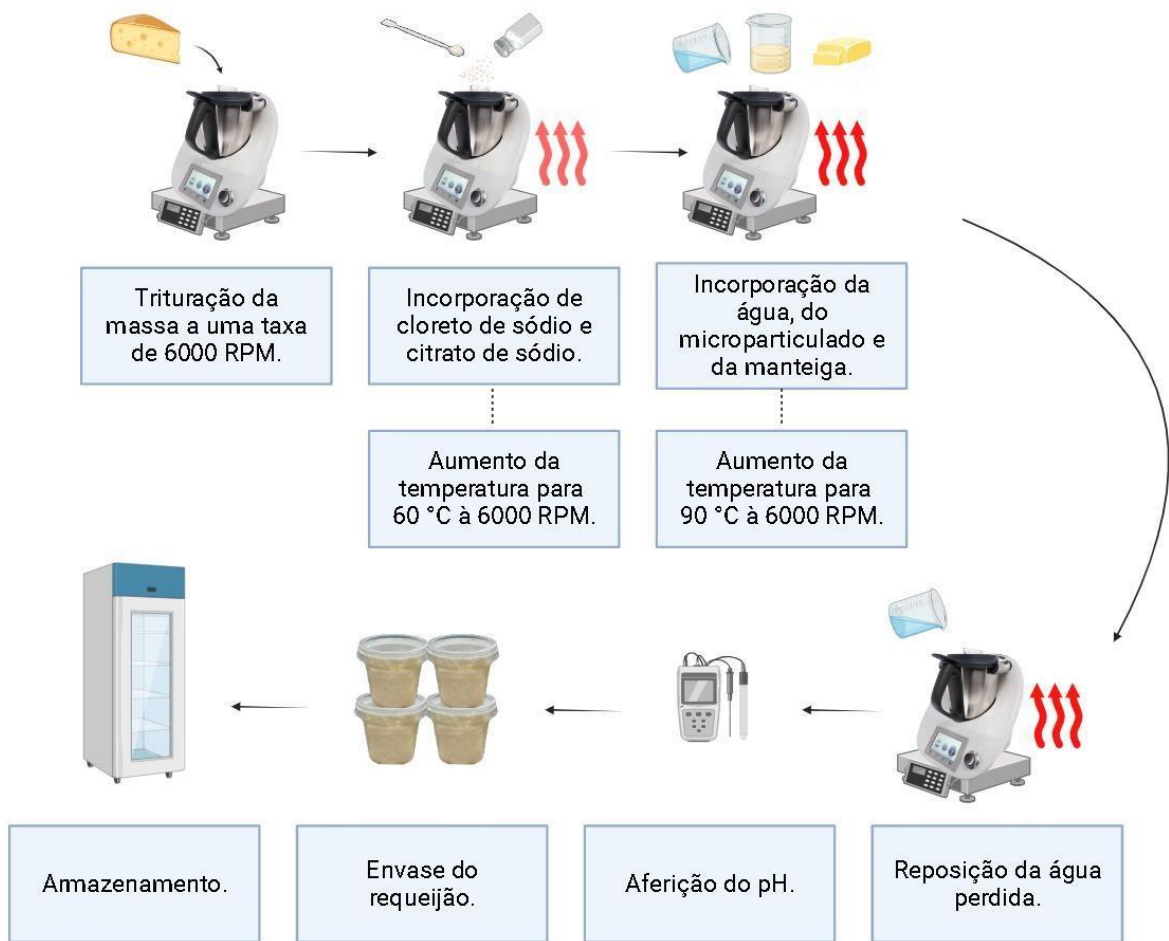
Após a conclusão das atividades do simulador de processos, o Requeijão foi transferido, ainda quente, para recipientes plásticos de 145 mL, que foram previamente esterilizados, e posteriormente armazenados sob refrigeração a  $5 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . As cinco formulações descritas acima, T1 a T5, foram produzidas em triplicata ( $n = 3$ ).

**Figura 5** - Fluxograma da produção de Requeijões sem adição de MWP (T1).



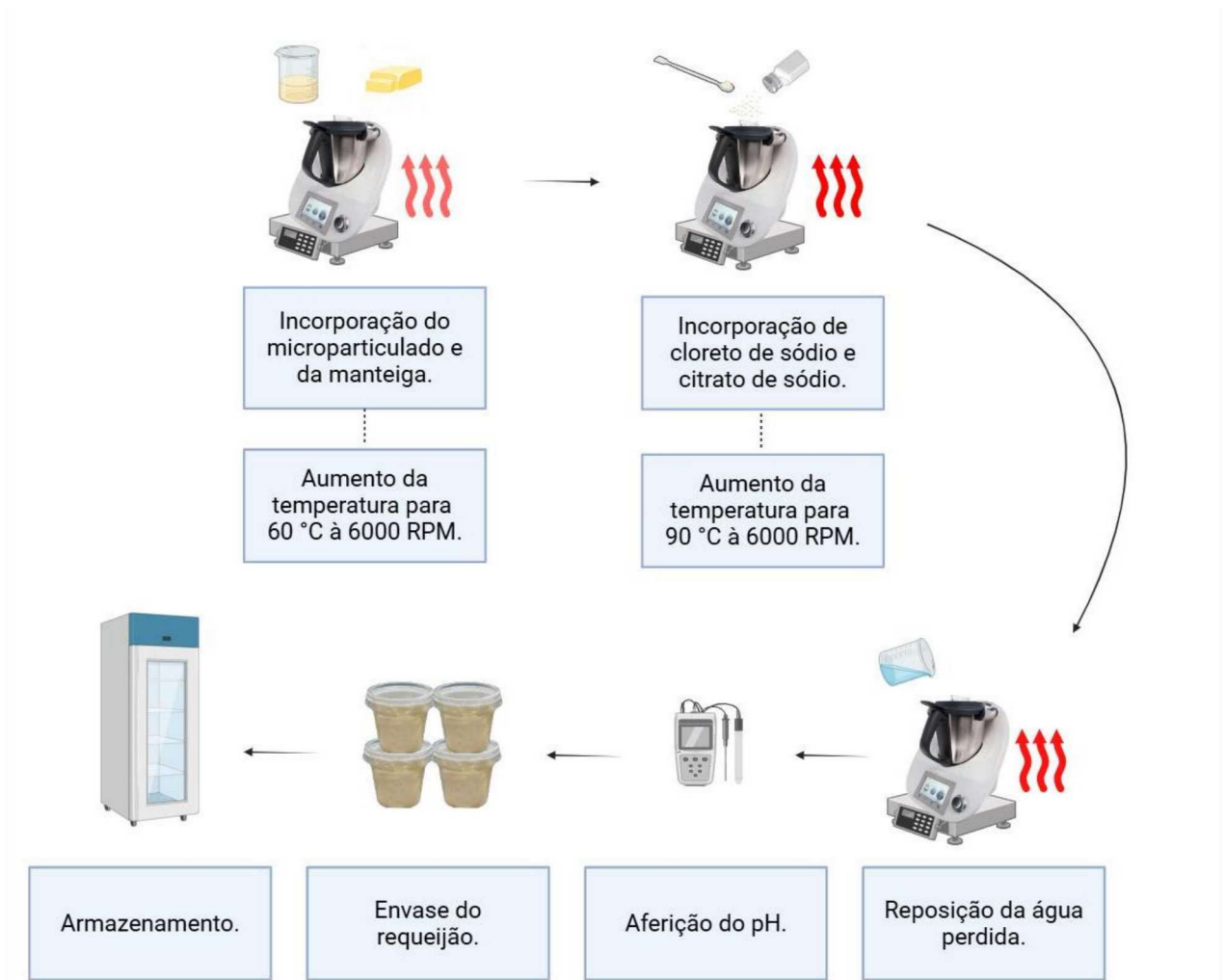
Fonte: Criado com Biorender.com (2024).

**Figura 6** - Fluxograma da produção de Requeijões com a substituição da massa enzimática por MWP (T2, T3 e T4).



Fonte: Criado com Biorender.com (2024).

**Figura 7** - Fluxograma da produção de Requeijões com a substituição dada massa enzimática MWP (T5).



Fonte: Criado com Biorender.com (2024).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Para espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio da proteína microparticulada, utilizou-se um espectrômetro interferométrico Bruker modelo Vertex 70v acoplado acessório de reflectância total atenuada (ATR), operando com resolução espectral de 4,0  $\text{cm}^{-1}$  e faixa espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA

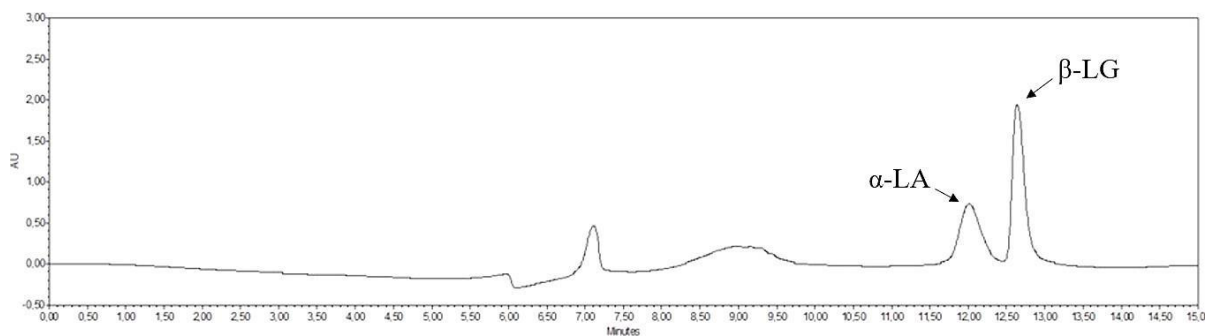
Para análise de distribuição do tamanho das partículas, foi utilizado o analisador de tamanho de partículas por difração a laser LS 13320 (modelo: Beckman Coulter) com módulo líquido

aquoso. Uma solução de  $10 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  das amostras foi preparada e adicionadas direta e lentamente ao reservatório do equipamento. A aquisição dos resultados foi realizada com o software Beckman Coulter versão 5.03. O modelo matemático escolhido para obtenção dos resultados foi o Fraunhofer, esse modelo tem como particularidade não precisar das características ópticas (índice de refração) do material analisado. Os resultados estão representados como  $Dv_{90}$  (diâmetro hidrodinâmico correspondente a 90% do volume das partículas).

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (HPLC)

No método por HPLC (do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*), foi usada fase reversa e o equipamento da marca Waters, modelo 1525, com detector PAD (do inglês, *Photodiode Array Detector*) e equipado com uma bomba binária. A separação cromatográfica utilizou uma coluna *Phenomenex Luna C18 5 $\mu\text{m}$*  (250 mm  $\times$  4,6 mm) 100 Å, que foi mantida a 40 °C durante a corrida. O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ , e  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG foram detectadas no comprimento de onda de 214 nm. A Figura 3 apresenta um cromatograma obtido para os padrões de  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG da marca Sigma-Aldrich® (De Paula, et al).

**Figura 8** - Cromatogramas dos padrões de  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG



Fonte: Adaptado de De Paula, 2024.

A eluição gradiente foi realizada com uma mistura de dois solventes a uma taxa de fluxo de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . A fase móvel consistia em 0,1% de TFA em água ultrapura (solvente A) e 0,09% de TFA em 90% de Acetonitrila e 10% de água ultrapura (solvente B). Um programa de gradiente linear foi utilizado segundo Tabela 4.

**Tabela 4.** Modo de eluição gradiente aplicado para determinação das frações proteicas  $\alpha$ -LA e  $\beta$ -LG.

| Tempo (min) | Fluxo (mL.min <sup>-1</sup> ) | Solvente A (%) | Solvente B (%) |
|-------------|-------------------------------|----------------|----------------|
| 0           | 0,5                           | 80             | 20             |
| 3           | 0,5                           | 60             | 40             |
| 5           | 0,5                           | 55             | 45             |
| 7           | 0,5                           | 50             | 50             |
| 9           | 0,5                           | 20             | 80             |
| 14          | 0,5                           | 80             | 20             |
| 15          | 0,5                           | 80             | 20             |

Fonte: Adaptado de De Paula, 2024.

### 3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A medição do pH foi realizada em triplicata com o auxílio de um pHmetro (marca: Gehaka), com a faixa de calibração entre 4 e 7. A avaliação da umidade foi conduzida pesando 3 g do Requeijão, em seguida o material foi submetido a uma temperatura de  $(100 \pm 2)$  °C, em estufa (marca: DeLeo), durante um período necessário para a estabilização da massa. O método de umidade descrito acima foi uma adaptação do método oficial n° 925.10 estabelecido pela AOAC International (1995).

A gordura foi realizada em duplicata e quantificada de acordo com o Método de Gerber, como estipulado pela Instrução Normativa n° 68, datada de 12 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006). Pesou-se 3 g no recipiente de amostra do butirômetro, adaptando-o, e em seguida adicionou-se 5 mL de água destilada à 60 °C. Transferiu-se, lentamente, 10 mL de ácido sulfúrico para análise de leite  $92 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$  para o butirômetro, e o agitou até total dissolução da amostra. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de álcool isoamílico  $90 \text{ mL.}100 \text{ mL}^{-1}$  e água destilada, à 60 °C, até a escala 30% do butirômetro. Agitou-o e o centrifugou por 5 minutos à 1200 rpm. Por fim, foi realizada a leitura do teor de gordura. O teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado pela razão entre a quantidade de gordura no Requeijão e o conteúdo de extrato seco total (EST), com os resultados expressos em termos percentuais ( $\text{g.}100 \text{ g}^{-1}$ ).

A análise de cor foi realizada em triplicata mediante um Colorímetro chroma meter CR 400 (marca: Konica Minolta), e os parâmetros foram registrados nas coordenadas a\* (positivo: vermelho, negativo: verde), b\* (positivo: amarelo, negativo: azul) e L\* (luminosidade), além do cálculo feito para análise do índice de escurecimento, *Browning Index*, (BI). A análise de cálcio

iônico foi realizada em triplicata utilizando o equipamento LAQUAtwin Ca<sup>2+</sup> (marca: Horiba) e para as medidas foram preparadas soluções de 10 g.100 mL<sup>-1</sup> dos Requeijões. A análise de proteína foi feita pelo método Kjeldahl (ISO 8968-1:2014) em laboratório credenciado.

### 3.7 AVALIAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO

O teor percentual de resíduo mineral fixo (RMF) foi medido através da incineração das amostras em forno mufla QUIIMS<sup>®</sup> à 550 °C até obtenção das cinzas. O RMF foi calculado através da equação 1 (BRASIL, 2014).

$$\text{Resíduo mineral fixo (\% m/m)} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_0)} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

m<sub>2</sub>: massa do cadinho após a incineração;

m<sub>1</sub>: massa do cadinho de porcelana;

m<sub>0</sub>: massa de amostra pesada.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DAS FORMULAÇÕES

A avaliação da consistência do Requeijão foi realizada em triplicata após um período de refrigeração de 5 °C ± 2 °C de 7 dias, utilizando um consistômetro de Bostwick (CSC Scientific Company, 2013). O dispositivo foi posicionado em uma superfície plana e teve sua inclinação e ângulo ajustados. As amostras de Requeijão, aquecidas previamente a 50 °C, foram introduzidas no reservatório do aparelho até sua capacidade máxima. Utilizando um cronômetro, o tempo de 30 segundos foi definido a fim de medir a distância deslocada das amostras na régua embutida do próprio equipamento.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DERRETIMENTO

A capacidade de derretimento (CD) foi feita utilizando o método de Schreiber, descrito por Kosikowski (1982). As amostras foram pesadas, 5 gramas, em uma placa de Petri e dispostas dentro de um círculo demarcado, em seguida foram submetidas a um aquecimento, utilizando um forno convencional de bancada, de 100 °C por 7 minutos. Finalizado o aquecimento, essas foram retiradas

e dispostas no mesmo círculo para o cálculo da diferença de área ser feita, possibilitando assim, a averiguação do quanto havia sido a variação no diâmetro de espalhamento do Requeijão. Para a medição da área utilizou-se o software ImageJ e para o cálculo usou-se a equação 2 (Wang, 2002).

$$CD = \frac{(A_f)}{(A_0)} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

CD: Capacidade de derretimento

A<sub>f</sub>: Área final (cm<sup>2</sup>)

A<sub>0</sub>: Área inicial (cm<sup>2</sup>)

### 3.10 AVALIAÇÃO DE TEXTURA

O equipamento para análise de textura Brookfield (modelo: CT3 Texture Analyzer) foi usado para medição dos parâmetros dureza, coesão, índice de elasticidade, mastigabilidade e gomosidade. O método de TPA (*texture profile analysis*) foi aplicado com a sonda TA11/100, com uma profundidade de amostra de 6,0 mm, força de execução de 6,8g e velocidade de análise de 0,5 mm/s.

### 3.11 AVALIAÇÃO REOLÓGICA

A análise reológica foi realizada utilizando o reômetro Thermo Scientific (modelo: Haake Viscotester iQ) e o modelo Herschel-Bulkley para o ajuste do gráfico de taxa de cisalhamento (eixo X). Utilizou-se a geometria de placas paralelas com uma temperatura de análise de 22 °C. A aquisição de dados foi conduzida com um aumento de 0,1 s<sup>-1</sup> para 100,0 s<sup>-1</sup> ao longo de um período de 200 s e uma diminuição de 100,00 s<sup>-1</sup> para 0,1 s<sup>-1</sup> ao longo de um período de 200 s.

### 3.12 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Utilizou-se a espectroscopia Raman para monitorar alterações estruturais químicas e investigar possíveis diferenças entre as formulações de Requeijão. Os espectros para os Requeijões foram adquiridos utilizando um espectrômetro Raman interferométrico (marca: Bruker RFS 100) e suas condições para a aquisição espectral incluíram o uso de um laser com comprimento de onda



de excitação de 1064 nm, potência de 300 mW, totalizando 512 varreduras acumuladas (scans) e uma resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

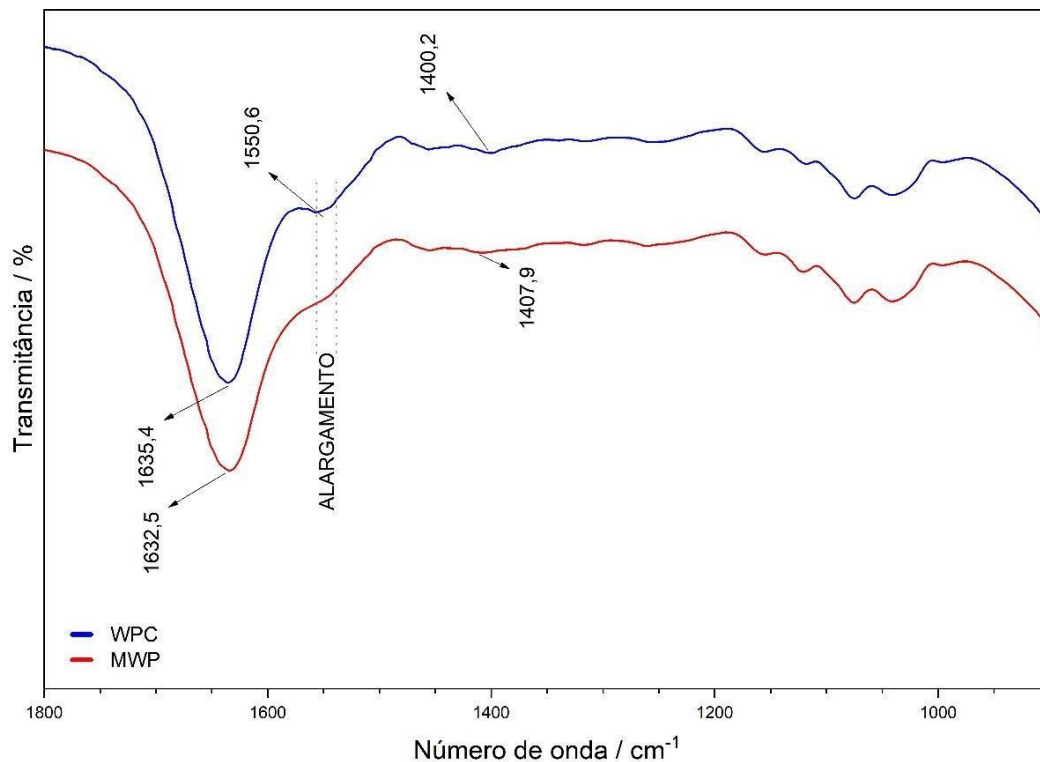
A comparação entre as médias dos dados foi realizada com um nível de significância de 0,05 pelo teste de Tukey, sendo executada no software R<sup>®</sup> (The R Project for Statistical Computing) versão 4.3.1.

## 4 RESULTADOS

Nos próximos tópicos serão apresentados os resultados e discussões embasadas nas análises propostas.

### 4.1 CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAL E DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DAS AMOSTRAS DE WPC E MWP

A partir dos espectros obtidos na região do infravermelho para as amostras de WPC e MWP, como apresentado na Figura 9, algumas mudanças podem ser observadas. As bandas em 1632 e 1635  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de estiramento C=O de amidas, conhecidas como região de Amida I. Essas bandas são sensíveis às alterações no ambiente proteico, refletindo mudanças na estrutura secundária das proteínas, como  $\beta$ -folhas e  $\alpha$ -hélices. A banda na região em torno de 1550  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibrações de Amida II, associada ao modo de deformação angular N-H e estiramento C-N. O alargamento observado na amostra de MWP pode indicar uma maior heterogeneidade estrutural ou mudanças nas interações intermoleculares, como aumento na desnaturação proteica ou formação de novos agregados proteicos. A banda na região de 1400  $\text{cm}^{-1}$ , resultado da vibração  $\text{COO}^-$  das cadeias laterais das proteínas, apresentam variações de intensidade e posição nessa faixa para ambas as amostras, podendo ser atribuídas à reorganização estrutural das proteínas durante o processo de microparticulação (Barth, 2007; Dong et al., 1990).

**Figura 9** - Espectro na região do Infravermelho de WPC e MWP

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A Tabela 5 apresenta os resultados das concentrações das proteínas em forma nativa, beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina, antes e após o tratamento de microparticulação, bem como os teores de desnaturação. Como esperado,  $\beta$ -LG apresentou um maior índice de desnaturação adicional (98,37%) em comparação com  $\alpha$ -LA (86,34%) devido a sua maior instabilidade associada (Park et al., 2015).

**Tabela 5.** Concentração e porcentagem de desnaturação, por HPLC, de  $\beta$ -LG e  $\alpha$ -LA antes e após o tratamento de microparticulação.

| Amostra*/Proteína                 | $\beta$ -LG   | $\alpha$ -LA  |
|-----------------------------------|---------------|---------------|
| WPC (g.100 g <sup>-1</sup> )      | 2,835 ± 0,540 | 0,703 ± 0,100 |
| MWP (g.100 g <sup>-1</sup> )      | 0,046 ± 0,001 | 0,096 ± 0,001 |
| <b>Desnaturação adicional (%)</b> | <b>98,37</b>  | <b>86,34</b>  |

\*WPC: WPC80 e permeado; MWP: Solução proteica microparticulada.

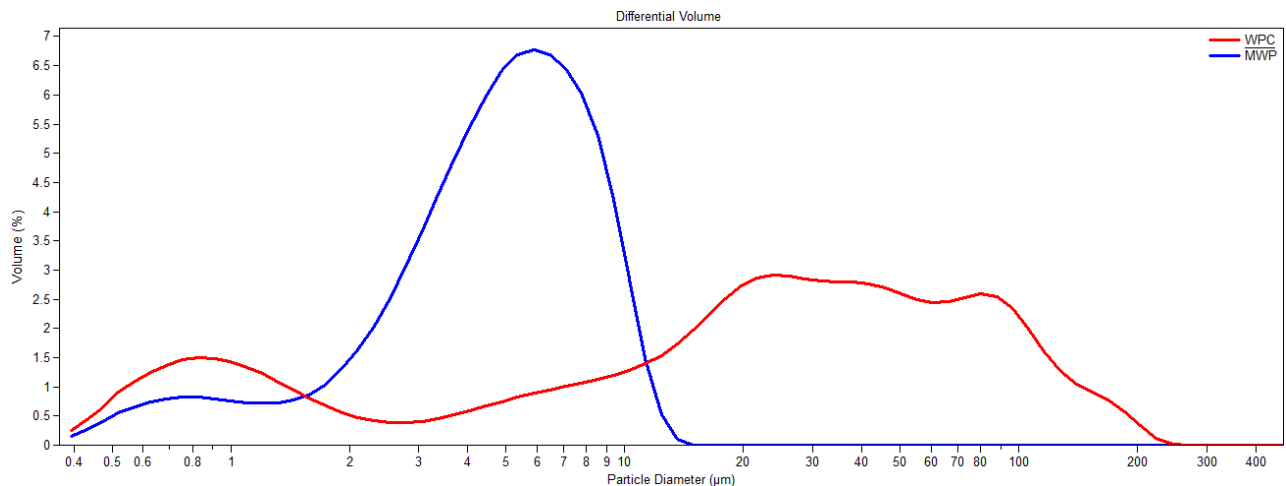
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A partir da Figura 10, pode-se observar a distribuição do tamanho das partículas presentes nas soluções de WPC e MWP. Comparando-se as curvas é possível notar que, antes do tratamento

de microparticulação, as partículas apresentavam maiores tamanhos e uma distribuição de volume das partículas mais ampla ou heterogênea, enquanto após o tratamento da solução de WPC, 90% do volume das partículas se encontraram com tamanhos inferiores a 10  $\mu\text{m}$  e uma distribuição de partícula mais uniforme, sendo esse o almejado para o produto microparticulado.

**Figura 10** - Distribuição do tamanho de partícula antes e após o tratamento de microparticulação.

\*WPC: WPC80 e permeado; MWP: Solução proteica microparticulada.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

## 4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS FORMULAÇÕES DE REQUEIJÃO

A Tabela 6 apresenta a caracterização das propriedades físico-químicas de diferentes formulações de Requeijão, em termos de pH, umidade, gordura, cálcio livre e proteína total. As formulações são identificadas de T1 a T5, onde a porcentagem entre parênteses (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) identificam as quantidades de substituição de massa enzimática por MWP.

**Tabela 6.** Caracterizações das diferentes formulações de Requeijão.

| Formulação/<br>Parâmetros | pH                       | Umidade<br>(g.100 g <sup>-1</sup> ) | Gordura<br>(g.100 g <sup>-1</sup> ) | GES<br>(g.100 g <sup>-1</sup> ) | Ca <sup>2+</sup><br>(mmol)* | Proteína<br>(g.100 g <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <b>T1</b>                 | 5,54 ± 0,04 <sup>a</sup> | 59,01 ± 0,28 <sup>a</sup>           | 22,75 ± 0,41 <sup>a</sup>           | 55,51 ± 1,17 <sup>a</sup>       | 34,89 ± 1,96 <sup>a</sup>   | 11,07 ± 0,12 <sup>a</sup>            |
| <b>T2</b>                 | 5,56 ± 0,03 <sup>a</sup> | 59,11 ± 0,98 <sup>a</sup>           | 22,92 ± 0,66 <sup>a</sup>           | 56,08 ± 2,15 <sup>a</sup>       | 45,44 ± 2,75 <sup>b</sup>   | 9,89 ± 0,03 <sup>b</sup>             |
| <b>T3</b>                 | 5,54 ± 0,03 <sup>a</sup> | 59,37 ± 0,69 <sup>a</sup>           | 22,92 ± 0,66 <sup>a</sup>           | 56,41 ± 1,69 <sup>a</sup>       | 53,89 ± 2,71 <sup>c</sup>   | 8,80 ± 0,01 <sup>c</sup>             |
| <b>T4</b>                 | 5,53 ± 0,04 <sup>a</sup> | 58,65 ± 1,11 <sup>a</sup>           | 22,67 ± 1,03 <sup>a</sup>           | 54,67 ± 3,05 <sup>a</sup>       | 60,56 ± 3,94 <sup>d</sup>   | 7,58 ± 0,12 <sup>d</sup>             |
| <b>T5</b>                 | 5,51 ± 0,03 <sup>a</sup> | 59,80 ± 1,06 <sup>a</sup>           | 22,80 ± 0,83 <sup>a</sup>           | 57,21 ± 1,78 <sup>a</sup>       | 72,00 ± 5,64 <sup>e</sup>   | 6,54 ± 0,13 <sup>e</sup>             |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\*Análise de cálcio iônico feita em solução aquosa 10 g de Requeijão/100 g de água (10 % m/v) em triplicata.

\*\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Em relação à análise de pH, nenhuma formulação apresentou diferença estatística entre si, além de manterem a faixa almejada de 5,5 Para a umidade, verifica-se que não existe diferença estatística significativa (P<0,05), assegurando assim um padrão do produto final. A análise estatística do teor de gordura nas diferentes formulações de Requeijão, conforme apresentado na Tabela 3, indica que não houve diferença estatística significativa (P<0,05) entre os tratamentos. Isso sugere que a variação no percentual de microparticulado adicionado não afetou significativamente o teor de gordura nas formulações de Requeijão estudadas, principalmente devido ao balanço das formulações entre os ingredientes. Em relação à gordura no extrato seco, como seu cálculo é feito a partir da umidade e gordura das amostras o GES não apresentou variação entre as diferentes formulações, mantendo assim um padrão final. Contudo, dentre as 5 formulações a amostra T5 não possui adição de massa enzimática durante seu preparo, mesmo estando dentro de todos os parâmetros físico químicos para Requeijão Cremoso, fazendo com que ela seja melhor classificada como creme de queijo.

Mesmo com uma redução em torno de 59% do teor proteico de T1 para T5 (11,07 ± 0,12 para 6,54 ± 0,13 g.100 g<sup>-1</sup> respectivamente) foi possível manter os parâmetros de umidade e extrato seco total de todas as amostras devido à adição do permeado de soro no preparo do MWP. O permeado possui em sua composição minerais e carboidrato, fazendo com que o teor de sólido seja mantido compensando assim, a diminuição proteica. Quanto ao cálcio, as diferenças estatísticas (P>0,05) entre as formulações, sugerem que seu aumento acompanha, proporcionalmente, o aumento do MWP. A formulação T5 apresentou o maior teor de cálcio iônico (72,00 ± 5,64 mmol)

e é, estatisticamente, diferente das outras formulações (T1 a T4), que possuem menor teor de MWP. Esse resultado é previsível, considerando que durante a fabricação do MWP ocorre a adição de cloreto de cálcio.

Em relação a análise de proteína todas as formulações se diferenciam estatisticamente ( $P > 0,05$ ). O Requeijão T1 possui na sua constituição maior teor proteico ( $11,07^a \pm 0,12 \text{ g.100 g}^{-1}$ ), tendo sua fonte de sólidos lácteos não gordurosos advindos da massa enzimática. Conforme adiciona-se uma maior concentração de MWP e há uma diminuição da massa enzimática, há concomitantemente, um menor teor proteico nas formulações, já que há  $10 \text{ g.100 g}^{-1}$  de proteína no MWP, e na massa enzimática (muçarela), de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO),  $22,6 \text{ g.100 g}^{-1}$  de proteína (TACO, 2011). Dessa forma, a formulação T5, onde ocorre a total substituição de massa enzimática por MWP possui o menor percentual de proteína dos cinco produtos ( $6,54 \pm 0,13 \text{ g.100 g}^{-1}$ ).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO RESÍDUO MINERAL FIXO

A Tabela 7 apresenta o resíduo mineral fixo (RMF) das amostras de Requeijão com diferentes substituições de massa enzimática por MWP.

**Tabela 7.** Resíduo mineral fixo das formulações de Requeijão.

| <b>Formulação</b> | <b>Resíduo mineral fixo<br/>(g.100 g<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------|--|
| <b>T1</b>         | $3,43 \pm 0,01^{bc}$                                   |
| <b>T2</b>         | $3,57 \pm 0,01^b$                                      |
| <b>T3</b>         | $3,38 \pm 0,01^c$                                      |
| <b>T4</b>         | $3,55 \pm 0,04^b$                                      |
| <b>T5</b>         | $4,66 \pm 0,02^a$                                      |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Para as formulações de T1 a T4, observa-se que não houve variações significativas ( $P < 0,05$ ) nos valores de resíduo mineral fixo, todos permanecendo próximos. As pequenas variações apresentadas indicam que a substituição parcial por MWP não alteram drasticamente o conteúdo mineral do Requeijão até a proporção de 75%. Já a formulação T5 resultou em um aumento no valor

de RMF, significativamente maior quando comparada às outras amostras, sugerindo que a substituição total por MWP impacta de maneira mais acentuada o conteúdo mineral. O intervalo no RMF de  $3,43 \pm 0,01$  a  $4,66 \pm 0,01 \text{ g.100 g}^{-1}$  mostrou-se acima dos valores encontrados por Vieira (2022) (2,79 a 3,86 %) na substituição de massa de queijo por concentrado proteico para a formulação de Requeijão Culinário, e por Baroni et al. (1999) que obteve uma média de valores de 1,30% nas formulações de Requeijão Tradicional (Baroni et al., 1999; Vieira, 2022). Os maiores valores de RMF encontrados nas formulações produzidas podem estar associados à adição de cloreto de cálcio durante a fabricação do MWP e sua posterior adição nas amostras de requeijão. Contudo, para uma análise mais eficaz com relação a caracterização da composição mineral e seus teores, comparados à formulação controle, é necessário um estudo mais direcionado como, por exemplo, através da Espectroscopia Dispersiva de Energia de Raio X para uma análise semiquantitativa e qualitativa do conteúdo mineral presente nas cinzas das formulações.

#### 4.4 ANÁLISE COLORIMÉTRICA DAS FORMULAÇÕES

A Tabela 8 apresenta os resultados dos parâmetros de cor para diferentes formulações de Requeijão, variando de acordo com a quantidade substituição feita (0%, 25%, 50%, 70% e 100%) e a Figura 11 ilustra as cinco formulações produzidas. Os parâmetros de cor incluem  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  e o BI. O parâmetro  $a^*$  valor indica a posição da cor no eixo vermelho-verde, valores positivos de indicam vermelho, enquanto valores negativos indicam verde. Para o parâmetro  $b^*$  esse mostra a posição da cor no eixo amarelo-azul, os valores positivos indicam amarelo, enquanto valores negativos indicam azul. Já o parâmetro  $L^*$  varia de 0, que corresponde ao preto absoluto, até 100, que representa o branco absoluto, significando que quanto maior o valor, mais clara é a amostra. O BI indica o quanto as amostras escureceram, mensurando a tonalidade na faixa de cor marrom, seus resultados variam de 0 a 100, sendo que quanto maior o valor, maior o índice de escurecimento (Netto et al., 2023). Esse sistema é muito útil para descrições objetivas de cores, evitando ambiguidades e diferenças de percepção entre observadores diferentes. É especialmente relevante em contextos em que a consistência e precisão da cor são críticas, como em controle de qualidade, design e pesquisa em materiais.

**Tabela 8.** Resultados dos parâmetros de cor e índice de escurecimento das diferentes formulações de Requeijão.

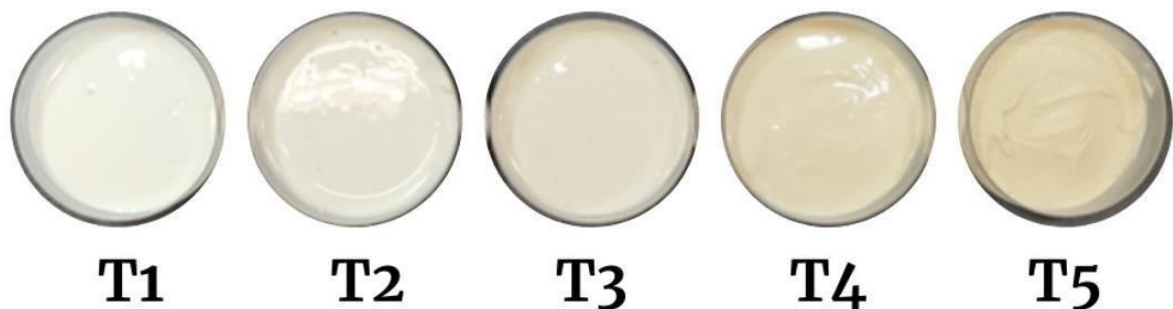
| Formulação/ Parâmetros | a*                        | b*                        | L*                        | BI                        |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>T1</b>              | -3,13 ± 0,24 <sup>a</sup> | 11,99 ± 0,56 <sup>a</sup> | 89,65 ± 0,44 <sup>a</sup> | 11,39 ± 0,73 <sup>a</sup> |
| <b>T2</b>              | -1,66 ± 0,41 <sup>b</sup> | 13,09 ± 0,52 <sup>b</sup> | 86,95 ± 0,73 <sup>b</sup> | 14,49 ± 0,88 <sup>b</sup> |
| <b>T3</b>              | -0,49 ± 0,13 <sup>c</sup> | 14,83 ± 0,13 <sup>c</sup> | 85,58 ± 0,37 <sup>c</sup> | 18,19 ± 0,14 <sup>c</sup> |
| <b>T4</b>              | 0,31 ± 0,53 <sup>d</sup>  | 18,44 ± 0,84 <sup>d</sup> | 81,89 ± 1,18 <sup>d</sup> | 25,20 ± 1,57 <sup>d</sup> |
| <b>T5</b>              | 0,89 ± 0,22 <sup>e</sup>  | 20,03 ± 0,22 <sup>e</sup> | 79,52 ± 0,39 <sup>e</sup> | 29,19 ± 0,49 <sup>e</sup> |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

**Figura 11 -** Fotografia das diferentes formulações de Requeijão.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A formulação controle (T1) apresentou resultados de  $a^*$ ,  $b^*$  e  $L^*$  próximos ao Requeijão Cremoso fabricado por Cunha et al. (2010) (GES = 60%, umidade = 63%) com valores de  $a^* = -0,23$ ,  $b^* = 10,37$  e  $L^* = 86,51$  (Cunha et al., 2010). Em relação aos parâmetros colorimétricos das diferentes formulações de Requeijão com adição variável de microparticulado, tem-se que para o parâmetro  $a^*$  (vermelho-verde) ocorre um aumento nos valores, sugerindo uma diminuição na intensidade do componente vermelho, indicando uma mudança na tonalidade do Requeijão em direção ao verde com a adição de MWP. Já os valores de  $b^*$  (amarelo-azul) aumentam nas formulações de T1 a T5, respectivamente, apontando para uma intensificação da cor amarela além de uma redução gradual na luminosidade, sugerindo que o Requeijão se torna um pouco mais escuro



com o aumento do MWP. O aumento de BI das amostras de Requeijão pode estar associado a reação de Maillard que tem a formação dos seus principais compostos por reações entre lactose e proteínas disponíveis no meio (Starowics e Zielinski, 2019). O permeado utilizado é rico em minerais e carboidratos, como lactose, podendo ele ser o principal responsável pelo escurecimento dos produtos com maiores teores de MWP.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA CONSISTÊNCIA DAS FORMULAÇÕES

A Tabela 9 apresenta as distâncias que foram percorridas no consistômetro de Bostwick pelas diferentes formulações, aquecidas previamente a uma temperatura de 50 °C, no tempo padronizado de 30 segundos.

**Tabela 9.** Medição da consistência das formulações de Requeijão (T1 a T5) por distância percorrida em 30 segundos.

| <b>Formulação</b> | <b>Consistência Bostwick<br/>(cm/30 s)</b> |
|-------------------|--|
| <b>T1</b>         | 5,55 ± 0,53 <sup>c</sup>                   |
| <b>T2</b>         | 7,50 ± 0,94 <sup>b</sup>                   |
| <b>T3</b>         | 6,57 ± 0,95 <sup>bc</sup>                  |
| <b>T4</b>         | 10,72 ± 0,48 <sup>a</sup>                  |
| <b>T5</b>         | 0,90 ± 0,27 <sup>d</sup>                   |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As distâncias percorridas pelas formulações variaram de 10,72 ± 0,48 (T4) a 0,90 ± 0,27 cm (T5). A análise estatística revelou que as formulações T1, T2 e T3 são estatisticamente semelhantes (P<0,05) olhando de maneira geral, já as formulações T4 e T5 diferem dos três primeiros produtos e entre si. Com relação a consistência do produto, essa pode estar diretamente ligada ao teor proteico e de cálcio presentes na massa enzimática. No caso da formulação T1, onde não há adição de MWP e a proteína advém somente da massa enzimática, pode-se observar uma menor fluidez em relação aos demais tratamentos, excluindo o T5. Essa característica pode estar relacionada ao sal fundente (citrato de sódio), visto que as cinco formulações possuem a mesma quantidade adicionada. No entanto, o aumento na concentração de sódio em relação ao cálcio proveniente da

massa enzimática, que diminui conforme essa é substituída por MWP, pode promover uma maior competição pelas cargas negativas da caseína. O cálcio liberado da caseína desloca-se, então, da forma coloidal para citrato de cálcio complexado solúvel, forçando a troca catiônica de espécies mais fortemente ligadas à caseína (Van Dender, 2014). Os demais tratamentos, onde a adição de massa enzimática diminuiu, possuem menores quantidades de cálcio com a mesma adição de sal fundente do tratamento T1. Dessa forma, as interações de cálcio e sal fundente podem estar influenciando na diminuição da consistência dos Requeijões com maior adição de MWP. Já para a formulação T5 observa-se uma mudança drástica em relação a consistência apresentada, tendo relação direta com a retirada por completo da massa enzimática. Nota-se que a formulação T4, que ainda possui uma substituição de 75% de massa enzimática por MWP, segue a mesma tendência de aumento de fluidez, enquanto quando ocorre a total substituição (T5) a fluidez decai bruscamente. Para uma avaliação mais precisa da diferença quantitativa entre sódio e cálcio, bem como para assegurar maior confiabilidade nas proposições relacionadas à consistência das formulações, seria recomendado realizar análises dos teores totais de sódio nas cinco formulações de Requeijão e de cálcio e sódio nos ingredientes utilizados.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DERRETIMENTO

O derretimento é uma importante propriedade funcional associada ao queijo devido ao seu uso em receitas, um exemplo é a utilização do próprio Requeijão, um tipo de queijo fundido ou queijo processado, em preparo de pizzas que são levadas ao forno em altas temperaturas, ou como recheios que necessitam de maior consistência após serem levadas ao aquecimento. Dependendo da necessidade atribuída ao produto almeja-se um derretimento menos ou mais expressivo.

A Tabela 10 apresenta a capacidade de derretimento de cada formulação de Requeijão produzida. De acordo com os resultados obtidos T1 apresentou a maior capacidade de derretimento, enquanto T5 a menor. Observando-se T2, que possui 25% de adição da solução de MWP, nota-se um decaimento considerável na capacidade de derretimento comparado a T1, enquanto para T5 não apresentou diferença estatística. Para T4 não houve diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em relação a T1 nem T5. De T2 a T4 houve um aumento na CD conforme há a maior substituição de massa enzimática por MWP, assim como Pinto (2007) observou maiores valores de derretimento conforme ocorreu a adição de WPC na produção de *cheese spread* (Pinto et al., 2007). Para Lübeck (2005), independentemente do valor de GES associado, quanto maior o teor de concentrado proteico adicionado, menor a capacidade de derretimento do Requeijão Cremoso, podendo ser feita uma comparação à formulação T5 que apresenta o menor valor de CD, demonstrando a singularidade do

produto (Lübeck, 2005). Outra característica atribuída às amostras é o escurecimento após o tempo estipulado de forneamento. Visualmente, as amostras T4 e T5 apresentaram uma coloração mais amarronzada do que as demais formulações como é visto na Figura 12.

**Tabela 10.** Medição da capacidade de derretimento das formulações de Requeijão (T1 a T5).

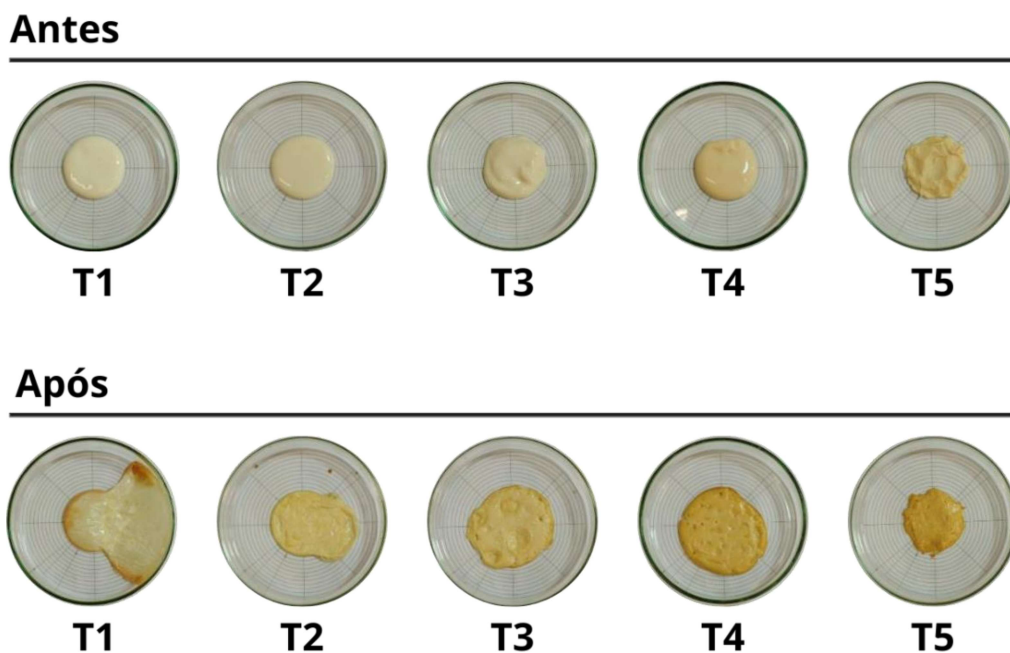
| Formulação | Capacidade de Derretimento   |
|------------|------------------------------|
| T1         | 230,61 ± 17,52 <sup>a</sup>  |
| T2         | 131,58 ± 22,43 <sup>b</sup>  |
| T3         | 150,86 ± 3,15 <sup>b</sup>   |
| T4         | 156,07 ± 32,35 <sup>ab</sup> |
| T5         | 108,57 ± 1,29 <sup>b</sup>   |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

**Figura 12 -** Fotografia antes e após o forneamento das diferentes formulações de Requeijão.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DE TEXTURA

A avaliação de textura foi feita considerando os parâmetros de dureza, coesão, índice de elasticidade, mastigabilidade e gomosidade, apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Avaliação de textura das diferentes formulações de Requeijão.

| Formulação/<br>Parâmetros | Dureza<br>(g)               | Coesão                    | Índice de<br>elasticidade | Gomosidade<br>(g)           | Mastigabilidade<br>(g)     |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <b>T1</b>                 | 35,33 ± 1,25 <sup>c</sup>   | 1,15 ± 0,32 <sup>a</sup>  | 1,16 ± 0,14 <sup>a</sup>  | 40,57 ± 10,87 <sup>b</sup>  | 44,23 ± 17,51 <sup>b</sup> |
| <b>T2</b>                 | 23,33 ± 1,18 <sup>c</sup>   | 0,98 ± 0,06 <sup>ab</sup> | 1,03 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 22,80 ± 2,11 <sup>b</sup>   | 23,60 ± 2,63 <sup>b</sup>  |
| <b>T3</b>                 | 47,83 ± 4,37 <sup>c</sup>   | 0,64 ± 0,08 <sup>bc</sup> | 0,87 ± 0,06 <sup>a</sup>  | 30,40 ± 1,56 <sup>b</sup>   | 26,53 ± 2,70 <sup>b</sup>  |
| <b>T4</b>                 | 145,33 ± 30,39 <sup>b</sup> | 0,36 ± 0,02 <sup>c</sup>  | 0,51 ± 0,05 <sup>b</sup>  | 52,47 ± 10,62 <sup>b</sup>  | 27,07 ± 7,49 <sup>b</sup>  |
| <b>T5</b>                 | 330,17 ± 33,13 <sup>a</sup> | 0,48 ± 0,03 <sup>c</sup>  | 0,58 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 157,20 ± 23,89 <sup>a</sup> | 90,90 ± 15,59 <sup>a</sup> |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ).

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O aumento nos valores de dureza e gomosidade conforme há uma maior substituição de massa enzimática por MWP (T2, T3, T4 e T5) segue a mesma tendência do Requeijão Cremoso (GES = 55g.100g<sup>-1</sup>) de Lübeck (2005), adicionado com diferentes quantidades de concentrado proteico de soro produzidos (Lübeck, 2005). A formulação T5 exibe a maior dureza (330,17 ± 33,13 g), o que indica uma textura extremamente firme comparada às outras amostras, esse fator é acompanhado de alta gomosidade (157,20 ± 23,89 g) e mastigabilidade (90,90 ± 15,59 g), sugerindo um maior esforço atribuído a mastigação da amostra. Em contraste, as formulações T1, T2 e T3 mostram valores reduzidos de dureza e são estatisticamente semelhantes ( $P < 0,05$ ), indicando texturas mais suaves além de apresentarem coesão e elasticidade moderadas. Já a formulação T4, mesmo sendo a com maior semelhança em relação à amostra T5 por apresentar 75% de substituição de massa enzimática por MWP, possui uma dureza quase duas vezes menor. Em termos de elasticidade, a variação entre as formulações é relativamente pequena, com T5 e T4 se destacando, ligeiramente, por valores menores quando comparadas as outras amostras. A diminuição de CD (Tabela 10) segue coerência com a perda de elasticidade vista na Tabela 11, que ocorre quando todos os queijos são aquecidos, já que a análise de derretimento é um parâmetro associado a força de interações caseína-caseína, e de T1 a T5 ocorre a substituição de caseína por MWP (Lucey et al.,

2003). Em resumo, a substituição gradativa da caseína, até a majoritária por MWP, traz modificações visíveis e mensuráveis nas propriedades texturais das diferentes formulações, podendo ser ajustada de acordo com a necessidade.

#### 4.8 AVALIAÇÃO REOLÓGICA

A Tabela 12 apresenta dados referentes à análise reológica das amostras de Requeijão.

**Tabela 12.** Avaliação reológica das diferentes formulações de requeijão.

| <b>Formulação/<br/>Parâmetros</b> | <b>y<sub>0</sub> - Tensão de<br/>escoamento<br/>inicial (Pa)</b> | <b>K- Índice de<br/>consistência<br/>(Pa.s<sup>n</sup>)</b> | <b>n - Índice de<br/>comportamento<br/>de fluxo</b> | <b>R<sup>2</sup> -Adequação<br/>do ajuste</b> | <b>η<sub>ap100</sub> valor<br/>medido<br/>(Pa.s)</b> |
|-----------------------------------|--|---|---|---|--|
| <b>T1</b>                         | 0,01 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 131,87 ± 7,79 <sup>a</sup>                                  | 0,41 ± 0,01 <sup>c</sup>                            | 0,9984 ± 0,0001 <sup>a</sup>                  | 8,50 ± 0,57 <sup>a</sup>                             |
| <b>T2</b>                         | 2,44 ± 1,20 <sup>b</sup>   | 28,81 ± 1,92 <sup>b</sup>                                   | 0,42 ± 0,01 <sup>c</sup>                            | 0,9990 ± 0,0001 <sup>a</sup>                  | 2,04 ± 0,06 <sup>c</sup>                             |
| <b>T3</b>                         | 1,75 ± 0,92 <sup>b</sup>   | 18,81 ± 1,89 <sup>bc</sup>                                  | 0,46 ± 0,01 <sup>bc</sup>                           | 0,9987 ± 0,0001 <sup>a</sup>                  | 1,59 ± 0,08 <sup>c</sup>                             |
| <b>T4</b>                         | 0,01 ± 0,01 <sup>b</sup>   | 10,66 ± 0,39 <sup>c</sup>                                   | 0,56 ± 0,01 <sup>b</sup>                            | 0,9986 ± 0,0001 <sup>a</sup>                  | 1,42 ± 0,05 <sup>c</sup>                             |
| <b>T5</b>                         | 114,08 ± 10,91 <sup>a</sup>                                      | 6,48 ± 2,29 <sup>c</sup>                                    | 0,83 ± 0,07 <sup>a</sup>                            | 0,9934 ± 0,0001 <sup>b</sup>                  | 3,93 ± 0,23 <sup>b</sup>                             |

T1 (controle); T2 (25% de substituição); T3 (50% de substituição); T4 (75% de substituição); T5 (100% de substituição).

\*\* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

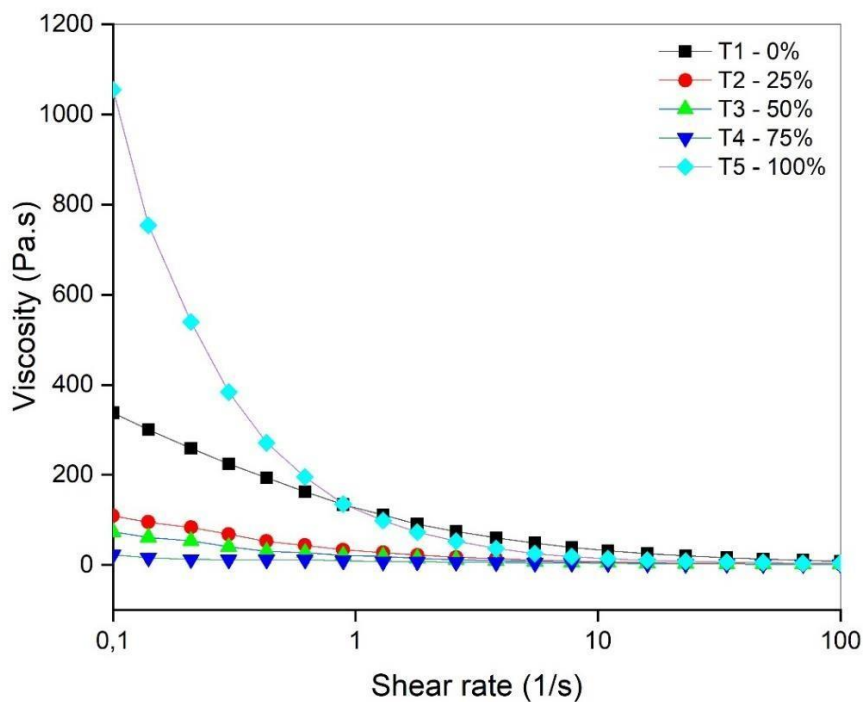
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os resultados expressos por K fazem referência à consistência das amostras, nesse caso sem aquecimento prévio como feito no consistômetro de Bostwick. Observa-se que T1 apresenta o maior valor (131,87 ± 7,79 Pa.s<sup>n</sup>), indicando uma alta consistência quando comparada às outras formulações. Conforme ocorre a substituição de massa enzimática por MWP a consistência tende a diminuir, bruscamente, até o valor mínimo de T5, quando ocorre a substituição total de caseína por proteínas do soro microparticuladas. Em relação ao índice de comportamento de fluxo (n) há uma variação de 0,41 a 0,83, valores próximos de 1 indicam comportamento Newtoniano, enquanto valores menores indicam comportamento pseudoplástico. A formulação T5 apresenta o maior valor de n dentre todas as formulações (0,83 ± 0,07 Pa.s), aproximando-se de um comportamento mais newtoniano, sugerindo que a eliminação completa da caseína altera significativamente o comportamento de fluxo do Requeijão.

A viscosidade aparente medida é um indicador direto da resistência ao fluxo sob uma taxa

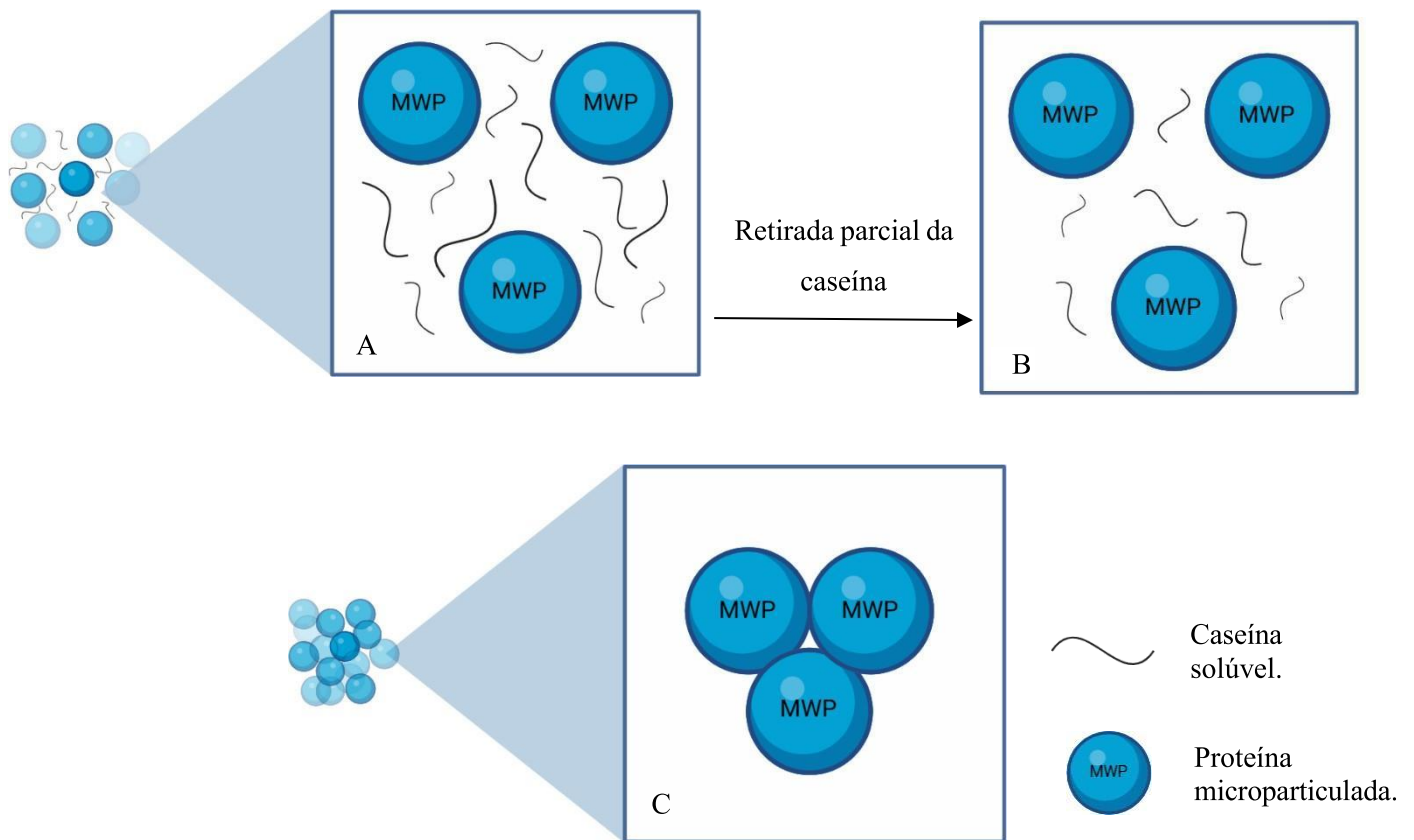
de cisalhamento específica, nesse caso a  $100 \text{ s}^{-1}$ . Observa-se que T1 apresenta a maior viscosidade aparente ( $8,50 \pm 0,57 \text{ Pa.s}$ ), à medida que a caseína é substituída por MWP há uma tendência de diminuição nos valores até T4, contudo, em T5, onde há 100% de substituição, a viscosidade aparente aumenta novamente. A diferença de viscosidade de T5 em relação as outras formulações observadas na Figura 13, pode estar associada a formação inicial de géis entre as proteínas do soro microparticulada. Kessler e Beyer (1991) sugerem que elevadas concentrações de proteína do soro em relação à caseína promovem a formação de agregados, resultando em um aumento significativo da viscosidade do produto. Eles também indicam que a baixa quantidade de caseína presente no sistema pode estar integrada à rede do gel. A Figura 14A demonstra o afastamento e impedimento da formação do gel de MWP com a presença da caseína solúvel, conforme ocorre a retirada parcial dessa, a formação do gel se mantém inviável devido ao bloqueio que a caseína ocasiona entre as partículas de MWP (Figura 14B). Contudo, quando há a uma ínfima concentração de caseína o produto (Figura 14C), a formação do gel de MWP é possibilitada, fazendo com que a viscosidade associada ao T5 seja muito acima das outras amostras. A discussão feita anteriormente pode ser o motivo principal associado a mudança da viscosidade observada, contudo outros fatores devem somatizar para a acentuação desse resultado (Kessler; Beyer, 1991).

**Figura 13** - Viscosidade aparente (Pa.s) das formulações baseada na taxa de cisalhamento de  $0,1 \text{ s}^{-1}$  a  $100 \text{ s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

**Figura 14** - Representação da formação de gel com mínima concentração de caseína após a substituição da massa enzimática por MWP.



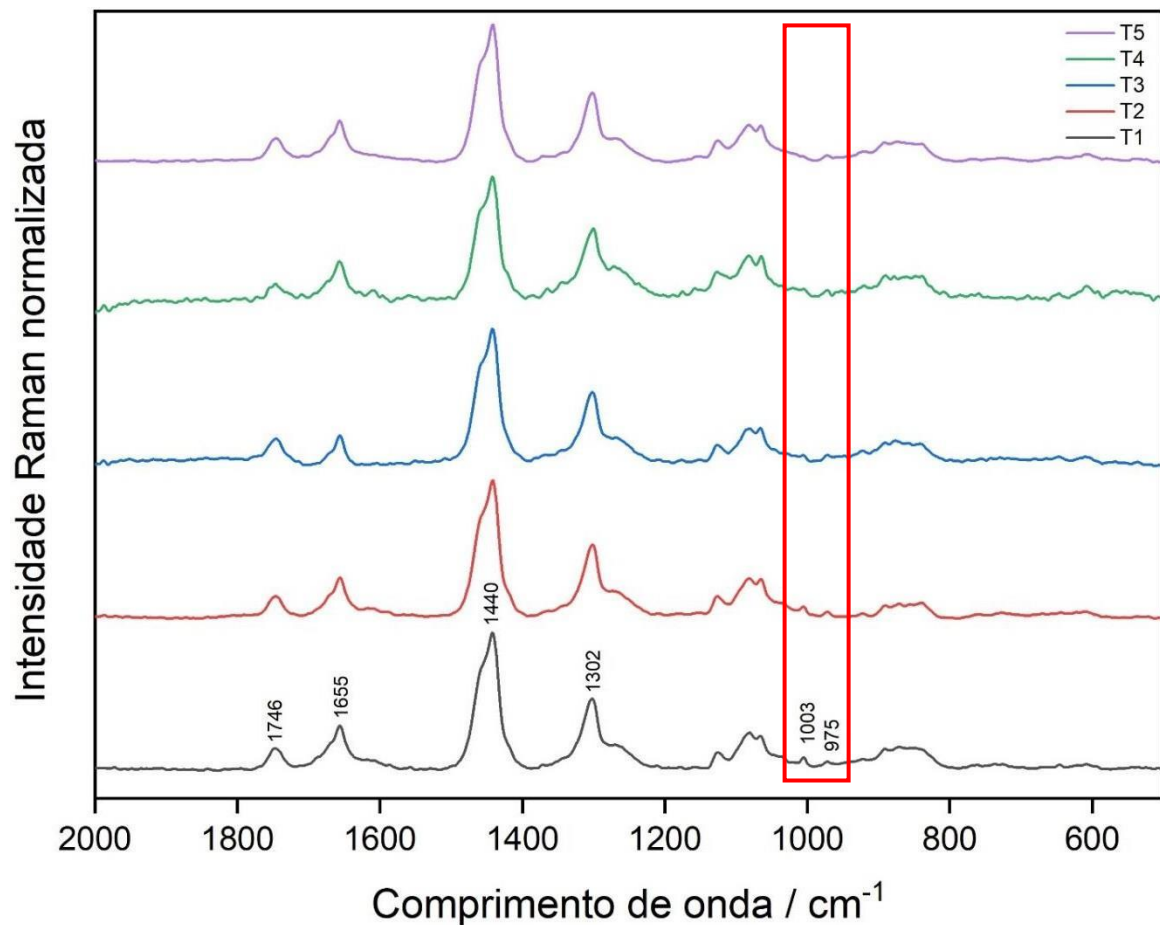
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os cinco espectros médios obtidos das diferentes formulações de Requeijão estão dispostos na Figura 5, suas principais diferenças estão nas intensidades relativas das bandas em  $1003\text{ cm}^{-1}$  e  $975\text{ cm}^{-1}$ . A primeira, destacada em vermelho na Figura 15, está associada a respiração do anel aromático da fenilalanina e a segunda, ao estiramento simétrico do ânion fosfato (Kuhar, 2021; Moustafa et al., 1998). A presença da fenilalanina é característica de diversos produtos lácteos, como a própria massa enzimática e a manteiga que foram utilizadas nas formulações, portanto sua presença já era esperada (Kim & Boutin, 2014). Sobre a presença dos grupos fosfato, a banda em  $975\text{ cm}^{-1}$  é comumente atribuída às ligações do grupo presentes entre resíduos de aminoácidos na caseína (Moustafa et al., 1998). Mudanças nas intensidades relativas dessas duas bandas podem estar associada a diferentes concentrações de proteínas presentes nas formulações. Dentre os

diferentes parâmetros associados a intensidade de uma banda Raman, a concentração de uma determinada substância, associada a sessão de choque, é também uma variável interferente. Nota-se que com o aumento das porcentagens de proteína de soro de leite microparticulado, há uma diminuição nas intensidades de ambas as bandas demarcadas em vermelho. A redução observada pode ser atribuída à substituição da muçarela por MWP, que não contém caseína significativamente e apresenta um conteúdo reduzido de fenilalanina. Sabe-se que o conteúdo médio de fenilalanina na caseína é de  $317 \mu\text{mol g}^{-1}$ , enquanto nas soro de proteínas, esse valor é de apenas  $228 \mu\text{mol g}^{-1}$  (Gorissen et al., 2020). A banda localizada em torno de  $1746 \text{ cm}^{-1}$  é associada ao modo vibracional de estiramento C–O, típico de ácidos graxos, enquanto a banda em  $1655 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento C–O de moléculas proteicas. A banda intensa em  $1440 \text{ cm}^{-1}$  faz referência às moléculas de lipídios, carboidratos e aminoácidos alifáticos nas proteínas do leite. Outra banda, indicativa da presença de lipídios, é encontrada em  $1302 \text{ cm}^{-1}$ , caracterizada na literatura como torção da ligação C–H (Herrero, 2008; Zhou et al., 2006).

**Figura 15** - Espectros Raman das diferentes formulações de Requeijão produzidas.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).



## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, observou-se que a substituição parcial ou total de massa enzimática (principalmente caseína) por MWP nas formulações de Requeijão impactou significativamente as características físico-químicas e de cor dos produtos. A substituição promoveu alterações na coloração, tornando as amostras mais avermelhadas e amareladas, além de reduzir a luminosidade, conforme evidenciado pelo aumento no *Browning Index* (BI). No que se refere à textura, houve um aumento na dureza e gomosidade, principalmente nas formulações com maior porcentagem de substituição. As análises reológicas revelaram uma diminuição da viscosidade com a substituição até 75% (T4), seguida de um aumento na formulação T5 devido a formação de géis entre as partículas de MWP, que antes possivelmente eram impedidas devido a presença de uma maior concentração de caseína.

Essas alterações podem ser atribuídas à substituição da caseína (oriunda da massa enzimática) por MWP, que possui propriedades funcionais diferentes, influenciando a estrutura do Requeijão. Em especial, a formulação T5 apresentou características distintivas em comparação com as demais amostras, sugerindo que a substituição completa leva a um produto final com propriedades únicas. Esses resultados indicam que a substituição parcial pode ser viável para modificar as características do Requeijão de maneira controlada, enquanto a substituição total pode gerar um produto com perfil sensorial e de textura significativamente diferente, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de novos produtos no mercado como produtos para coberturas de pizza e recheios.

## REFERÊNCIAS

- ABIQ – Associação Brasileira das Indústrias De Queijo. HISTÓRICO DA EVOLUÇÃO DO MERCADO BRASILEIRO DE QUEIJOS. São Paulo: **ABIQ**, 2019.
- Almeida, M. R., Oliveira, K. de S., Stephani, R., & de Oliveira, L. F. C. (2011). FOURIER-TRANSFORM RAMAN ANALYSIS OF MILK POWDER: A POTENTIAL METHOD FOR RAPID QUALITY SCREENING. **Journal of Raman Spectroscopy**, 42(7), 1548–1552
- Antunes, A. J. (2003). FUNCIONALIDADE DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO. Editora Manole Ltda.
- Antunes, I.C.; Bexiga, R.; Pinto, C.; Roseiro, L.C.; Quaresma, M.A.G. (2023). COW’S MILK IN HUMAN NUTRITION AND THE EMERGENCE OF PLANT-BASED MILK ALTERNATIVES. **Foods**, 12, 99.
- AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS N° 925.10 AOAC. Official methods of analysis International (1995).
- Baroni, A. F., Freitas, I. C., Cunha, R. L., Hubinger, M. D., & Menegalli, F. C. (1999). CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DE REQUEIJÃO CREMOSO TRADICIONAL E COM TEOR REDUZIDO DE GORDURA: VISCOSIDADE EXTENSIONAL E EM CISALHAMENTO. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2(1), 21-29.
- Barth, A. (2007). INFRARED SPECTROSCOPY OF PROTEINS. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1767(9), 1073–1101.
- Bastos, R. A. et al. (2013). AVALIAÇÃO DE PERCEPÇÃO E PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES EM RELAÇÃO A QUEIJO PRATO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora v. 68, n. 390, p. 12-19.
- BRASIL. Ministério do Estado da Agricultura e do Abastecimento. Aprova **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão ou Requesón**. Portaria n° 359, de 04 de dezembro de 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal. **Determinação do Resíduo Mineral Fixo em Leite e Derivados Lácteos**. RS, 2014.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos**.
- Chung, C.; Degner, B.; McClements, D. J. (2014). DEVELOPMENT OF REDUCED-CALORIE FOODS; MICROPARTICULATES WHEY PROTEINS AS FAT MIMETICS IN SEMI-SOLID FOOD EMULSIONS. **Food Research International**, v. 56, p. 136-145.
- Cunha, C. R., Dias, A. I., & Viotto, W. H. (2010). MICROSTRUCTURE, TEXTURE, COLOUR AND SENSORY EVALUATION OF A SPREADABLE PROCESSED CHEESE

- ANALOGUE MADE WITH VEGETABLE FAT. **Food Research International**, 43(3), 723-729.
- Dagleish, D. G., & Corredig, M. (2012). THE STRUCTURE OF THE CASEIN MICELLE OF MILK AND ITS CHANGES DURING PROCESSING. **Annual Review of Food Science and Technology**, 3(1), 449–467.
- De Paula, I., Cunha, C., Pinto, C., Vitral, J., Lazzarini, P.; Costa, J., Tavares, G., Perrone, I., de Oliveira, L., Stephani, R. (2025). DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHODOLOGY FOR QUANTIFICATION OF WHEY PROTEIN FRACTIONS IN MICROPARTICULATE INGREDIENTS. **Quim. Nova**, 48, e2025038.
- De Sá Oliveira, K., de Souza Callegaro, L., Stephani, R., Almeida, M. R., & de Oliveira, L. F. C. (2016). ANALYSIS OF SPREADABLE CHEESE BY RAMAN SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRIC TOOLS. **Food Chemistry**, 194, 441–446.
- Deshwal, G.K.; Gómez-Mascaraque, L.G.; Fenelon, M.; Huppertz, T. (2023). A REVIEW ON THE EFFECT OF CALCIUM SEQUESTERING SALTS ON CASEIN MICELLES: FROM MODEL MILK PROTEIN SYSTEMS TO PROCESSED CHEESE. **Molecules**, 28, 2085.
- Devries, M. C.; Phillips, S. M. (2015). SUPPLEMENTAL PROTEIN IN SUPPORT OF MUSCLE MASS AND HEALTH: ADVANTAGE WHEY. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 1, p. 8–15.
- Dong, A., Huang, P., & Caughey, W. S. (1990). PROTEIN SECONDARY STRUCTURES IN WATER FROM SECOND-DERIVATIVE AMIDE I INFRARED SPECTRA. **Biochemistry**, 29(13), 3303–3308.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (Eds.). (2003). **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**.
- Fox, P. F.; Brodtkorb, A.(2008). THE CASEIN MICELLE: HISTORICAL ASPECTS, CURRENT CONCEPTS AND SIGNIFICANCE. **International Dairy Journal**, Canadá, v. 18, p. 677-684.
- Gaucheron, F. (2011). MILK AND DAIRY PRODUCTS: A UNIQUE MICRONUTRIENT COMBINATION. **Journal of the American College of Nutrition**, 30(5), 400S–409S.
- Goulding, D. A., Fox, P. F., & O'Mahony, J. A. (2020). MILK PROTEINS: AN OVERVIEW. **Milk Proteins**, 21–98.
- Gorissen, S. H. M., Trommelen, J., Kouw, I. W. K., Holwerda, A. M., Pennings, B., Groen, B. B. L., van Loon, L. J. C. (2020). PROTEIN TYPE, PROTEIN DOSE, AND AGE MODULATE DIETARY PROTEIN DIGESTION AND PHENYLALANINE ABSORPTION KINETICS AND PLASMA PHENYLALANINE AVAILABILITY IN HUMANS. **The Journal of Nutrition**.
- Grappin, R., Dupont, D., Pochet, S., & Lefier, D. (2002). MILK PROTEINS | Analytical Methods. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 1967–1976.
- Haraguchi, F. K., Abreu, W. C. de, & Paula, H. de. (2006). PROTEÍNAS DO SORO DO

LEITE: COMPOSIÇÃO, PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, APLICAÇÕES NO ESPORTE E BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE HUMANA. **Revista de Nutrição**, 19(4), 479–488.

Herrero, A.M. (2008). RAMAN SPECTROSCOPY A PROMISING TECHNIQUE FOR QUALITY ASSESSMENT OF MEAT AND FISH: A REVIEW. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1642-1651.

Homer, S., Lundin, L., & Dunstan, D. E. (2021). HEAT-INDUCED WHEY PROTEIN MICROPARTICULATION UNDER CONTINUOUS SHEAR IN ACIDIC CONDITIONS. **Food Hydrocolloids**, 121, 107044.

Ipsen, R. (2017). MICROPARTICULATED WHEY PROTEINS FOR IMPROVING DAIRY PRODUCT TEXTURE. **International Dairy Journal**, 67, 73–79.

Javed H., Arshad S., Arif A., Shaheen F., Seemab Z., Rasool S., Ramzan H.S., Arsalan H.M., Ahmed S., Watto J.I. (2022): COMPARISON OF EXTRACTION METHODS AND NUTRITIONAL BENEFITS OF PROTEINS OF MILK AND DAIRY PRODUCTS: A REVIEW. **Czech J. Food Sci.**, 40: 331–344.

Karim, A., Aider, M. (2022). PRODUCTION OF PREBIOTIC LACTULOSE THROUGH ISOMERISATION OF LACTOSE AS A PART OF INTEGRATED APPROACH THROUGH WHEY AND WHEY PERMEATE COMPLETE VALORISATION: A REVIEW. **International Dairy Journal**, 126, 105249.

Kessler, H.-G., & Beyer, H.-J. (1991). THERMAL DENATURATION OF WHEY PROTEINS AND ITS EFFECT IN DAIRY TECHNOLOGY. **International Journal of Biological Macromolecules**, 13(3), 165–173.

Kim, J. and Boutin, M. (2014). A LIST OF PHENYLALANINE TO PROTEIN RATIOS FOR COMMON FOODS. **ECE Technical Reports**.

Kosikowski, F. V. (1982). CHEDDAR CHEESE AND RELATED TYPES. **Cheese and fermented milk foods**.

Kuhar, N., Sil, S., & Umapathy, S. (2021). POTENTIAL OF RAMAN SPECTROSCOPIC TECHNIQUES TO STUDY PROTEINS. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 258, 119712.

Lee, S., C. V. Morr, and E. Y. W. Ha. (1992). STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF CASEINATE AND WHEY PROTEIN ISOLATE AS AFFECTED BY TEMPERATURE AND PH. **J. Food Sci.** 57:1210–1214.

Li, Q.-B., Wang, W., Liu, C.-H., & Zhang, G.-J. (2015). DISCRIMINATION OF BREAST CANCER FROM NORMAL TISSUE WITH RAMAN SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRICS. **Journal of Applied Spectroscopy**, 82(3), 450–455.

Lübeck, G. M. (2005). **Estudo da fabricação de requeijão cremoso com diferentes concentrações de gordura no extrato seco, sal emulsificante e concentrado proteico de soro obtido por ultrafiltração**. 2005. Tese (Doutorado). Tecnologia de Alimento – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). INVITED REVIEW: PERSPECTIVES ON THE BASIS OF THE RHEOLOGY AND TEXTURE PROPERTIES OF CHEESE. **Journal of Dairy Science**, 86(9), 2725-2743.

Lucey, J.A.; MAURER-ROTHMANN, A.; KALIAPPAN, S. (2011). FUNCTIONALITY OF INGREDIENTS: EMULSIFYING SALTS. **Proc. Cheese Analogues**, v.1, p.110- 132.

MacDonald, L. E., Brett, J., Kelton, D., Majowicz, S. E., Snedeker, K., & Sargeant, J. M. (2005). A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS OF THE EFFECTS OF PASTEURIZATION ON MILK VITAMINS, AND EVIDENCE FOR RAW MILK CONSUMPTION AND OTHER HEALTH-RELATED OUTCOMES. **Journal of Food Protection**, 68(11), 1814-1832.

Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2010). INVITED REVIEW: PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF BIOACTIVE PEPTIDES OBTAINED FROM WHEY PROTEINS. **Journal of Dairy Science**, 93(2), 437-455.

Moustafa, Y. M., & El-Egili, K. (1998). INFRARED SPECTRA OF SODIUM PHOSPHATE GLASSES. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 240(1-3), 144–153.

Mozuraityte, R.; Berget, I.; Mahdalova, M. et al. (2019). SODIUM REDUCTION IN PROCESSED CHEESE SPREADS AND THE EFFECT ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES. **Int. Dairy J.**, v.90, p.45-55.

Netto, G.G., Francisquini, J.d., de Carvalho, A.F. et al. (2023). THE EFFECT OF INDUCED CRYSTALLIZATION OF LACTOSE ON DULCE DE LECHE PROPERTIES. **Eur Food Res Technol** 249, 283–294.

O'Connell JE, Saracino P, Huppertz T, Uniake T, de Kruif CG, Kelly AL, Fox PF. (2006). INFLUENCE OF ETHANOL ON THE RENNET-INDUCED COAGULATION OF MILK. **Journal of Dairy Resarch**, v.73, p.312-317.

Oliveira, K. d. S. (2014). **Análise de Requeijão por espectroscopia raman e ferramentas quimiométricas**. 2014. Tese (Mestrado) – Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

Onwulata, C. I. (Ed.). (2009). WHEY PROCESSING, FUNCTIONALITY AND HEALTH BENEFITS. **Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists**.

Park, Y. J., Kim, K. H., Lim, D. W., & Lee, E. K. (2015). **Effects of pH and protein conformation on in-solution complexation between bovine  $\alpha$ -lactalbumin and oleic acid: Binding trend analysis by using SPR and ITC**. *Process Biochemistry*, 50(9), 1379–1387.

Patty, V. (2022). **Efeito da adição de concentrado proteico de leite nas características do requeijão**. 2022. Tese (Mestrado) – Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Pérez, M. D., & Calvo, M. (1995). INTERACTION OF B-LACTOGLOBULIN WITH RETINOL AND FATTY ACIDS AND ITS ROLE AS A POSSIBLE BIOLOGICAL

FUNCTION FOR THIS PROTEIN: A REVIEW. **Journal of Dairy Science**, 78(5), 978–988.

Petit, J., Herbig, A.-L., Moreau, A., & Delaplace, G. (2011). INFLUENCE OF CALCIUM ON B-LACTOGLOBULIN DENATURATION KINETICS: IMPLICATIONS IN UNFOLDING AND AGGREGATION MECHANISMS. **Journal of Dairy Science**, 94(12), 5794–5810.

Pinto, S., Rathour, A. K., Prajapati, J. P., Jana, A. H., & Solanky, M. J. (2007). **Utilization of whey protein concentrate in processed cheese spread.**

Poppi FA, Costa M de R, De Rensis CMVB, Sivieri K (2015). SORO DE LEITE E SUAS PROTEÍNAS: COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE FUNCIONAL. **J. Health Sci.**

Rapacci, M. (1997). **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do Requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta.** 1997. Tese (Doutorado) – Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Renard, D. et al. (2002). HEAT-INDUCED FLOCCULATION OF MICROPARTICULATED WHEY PROTEINS (MWP); CONSEQUENCES FOR MIXED GELS MADE OF MWP AND B-LACTOGLOBULIN. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 24, n. 1, p. 73–85.

Ribeiro-Santos R, Souza ALS, Trombete FM, Melo NR. (2015). PROTEÍNA DO SORO DE LEITE: APROVEITAMENTO E APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE EMBALAGEM BIODEGRADÁVEL. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 10(5): 51-58.

Sarenkova I, Sáez-Orviz S, Ciprovica I, Rendueles M and Díaz M (2022) LACTOBIONIC ACID PRODUCTION BY PSEUDOMONAS TAETROLENS IN A FED-BATCH BIOREACTOR USING ACID WHEY AS SUBSTRATE. **International Journal of Dairy Technology** 75 361–371.

Silva, G. M. (2017). **Processo integrado para fracionamento das proteínas -lactoalbumina e -lactoglobulina do soro de leite.** 2017. Tese (Mestrado)-Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Silva, N. N., Casanova, F., Pinto, M. S., Carvalho, A. F., & Gaucheron, F. (2019). CASEIN MICELLES: FROM THE MONOMERS TO THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE. **Brazilian Journal of Food Technology**, 22, e2018185.

Smithers, G. W. (2008). WHEY AND WHEY PROTEINS—FROM “GUTTER-TO-GOLD.” **International Dairy Journal**, 18(7), 695–704.

Sousa, H. M. S. (2019). **Influência da temperatura na agregação e desnaturação da  $\beta$ -Lactoglobulina.** 2019. TCC (Bacharel) – Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Tocantins, Tocantins.

Starowicz, M., & Zieliński, H. (2019). HOW MAILLARD REACTION INFLUENCES SENSORIAL PROPERTIES (COLOR, FLAVOR AND TEXTURE) OF FOOD PRODUCTS? **Food Reviews International**, 1–19.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). NEPA ± UNICAMP, Campinas, ed. 4, rev. e ampl. - Campinas: **NEPA UNICAMP**, 2011.161 p.

Forti, Ana Paula. A ascensão do queijo muçarela e do Requeijão no Brasil. **Tetra Pak**. 2023. Disponível em: <https://www.tetrapak.com/pt-br/insights/caixas-de-ideias/visao-do-especialista/ascensao-do-queijo-muçarela-e-do-requeijao-no-Brasil>. Acesso em: 28/05/2024.

Thorning, T. K., Raben, A., Tholstrup, T., Soedamah-Muthu, S. S., Givens, I., & Astrup, A. (2016). MILK AND DAIRY PRODUCTS: GOOD OR BAD FOR HUMAN HEALTH? AN ASSESSMENT OF THE TOTALITY OF SCIENTIFIC EVIDENCE. **Food & Nutrition Research**, 60(1), 32527.

Van Dender, A. G. F. REQUEIJÃO CREMOSO E OUTROS QUEIJOS FUNDIDOS: TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO, CONTROLE DE PROCESSO E ASPECTO DE MERCADO. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: Editora Setembro, 2014.

Wang, H. (2002). MELTING CHARACTERISTICS OF CHEESE: ANALYSIS OF EFFECTS OF COOKING CONDITIONS USING COMPUTER VISION TECHNOLOGY. **Journal of Food Engineering**, 51(4), 305–310.

Zacarchenco, P.B et al. "REQUEIJAO" CULINARIO: HISTORIC, MARKET AND TECHNOLOGICAL ASPECTS. (2012). **Revista das Indústrias de Laticínios**, v.18, p.70-74.

Zadow, J. G. (1994). UTILISATION OF MILK COMPONENTS: Whey. **Robinson: Modern Dairy Technology**, 313–373.

Zhou,Q. et al. (2006). SEQUENTIAL CHANGES OF MAIN COMPONENTS IN DIFFERENT KINDS OF MILK POWDERS USING TWO-DIMENSIONAL INFRARED CORRELATION ANALYSIS. **Journal of Molecular Structure**, v. 799, p.77-84.

Çakır-Fuller, E. (2015). ENHANCED HEAT STABILITY OF HIGH PROTEIN EMULSION SYSTEMS PROVIDED BY MICROPARTICULATED WHEY PROTEINS. **Food Hydrocolloids**, 47, 41–50.