UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Thaís Lourenço Oliveira

Caracterização físico-química e espectroscópica de leite e derivados: aplicações na avaliação da estabilidade coloidal e da estrutura de matrizes lácteas

Juiz de Fora

2026

Thaís Lourenço Oliveira

Caracterização físico-química e espectroscópica de leite e derivados: aplicações na avaliação da estabilidade coloidal e da estrutura de matrizes lácteas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Juiz de Fora
2026

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

Oliveira, Thaís Lourenço.
Caracterização físico-química e espectroscópica de leite e derivados: aplicações na avaliação da estabilidade coloidal e da estrutura de matrizes lácteas / Thaís Lourenço Oliveira. -- 2026.
132 f. : il.

Orientador: Luiz Fernando Cappa de Oliveira
Coorientador: Rodrigo Stephani
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2026.

1. Espectroscopia vibracional. 2. Quimiometria. 3. Planejamento de misturas. 4. Gordura do leite. 5. Queijo Minas frescal. I. de Oliveira, Luiz Fernando Cappa, orient. II. Stephani, Rodrigo, coorient. III. Título.

Thaís Lourenço Oliveira

Caracterização físico-química e espectroscópica de leite e derivados: aplicações na avaliação da estabilidade coloidal e da estrutura de matrizes lácteas

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

Aprovada em 24 de agosto de 2026.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Claudia Moraes de Rezende
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
Universidade de Araraquara

Profa. Dra. Juliana de Carvalho da Costa
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Mara Rubia Costa Couri
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 31/07/2026.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Cappa de Oliveira**, **Professor(a)**, em 24/08/2026, às 17:55, 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 **Mara Rubia Costa Couri**, **Professor(a)**, em 24/08/2026, às 17:56, 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 **Hernane da Silva Barud**, **Usuário Externo**, em 24/08/2026, às 17:58, 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 **Juliana de Carvalho da Costa**, **Professor(a)**, em 24/08/2026, às 17:59, 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 **CLAUDIA MORAES DE REZENDE**, **Usuário Externo**, em 24/08/2026, às 18:00, 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 **Rodrigo Stephani**, **Professor(a)**, em 24/08/2026, às 19:13, 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-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3116848** e o código CRC **351DC5F2**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, minha mãe (Lúcia), meu pai (Éder), minha filha (Mariana) e a Mônica, que são minha base e meu porto seguro. Vocês estiveram ao meu lado ao longo desta caminhada, que não foi nada fácil, e, mesmo diante das dificuldades, nunca deixaram de me incentivar a seguir em frente.

Ao meu namorado, Gustavo Henrique, pelo companheirismo e por sempre me encorajar a não abrir mão dos meus sonhos. Te amo!

A todos os amigos que fizeram parte desta trajetória: sem vocês, eu não teria percorrido nem metade do caminho, e cada um teve um papel muito importante na construção da minha carreira científica. Deixo um abraço especial ao trio tobogã (Paulo e William) e aos amigos do Neem-extendido (Camille, Cassiane, Daphne, Gabriel, Gabriela, Gustavo, Hudson, Iuri, João, João Pedro II, Julliana, Kaíque, Laís, Linus, Mariana, Marina, Natalia Alves, Nathalia Campos, Patrick, Perrel, Thayla e Vitória).

Ao meu orientador, Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, pelo apoio constante desde o mestrado e pela ajuda sempre presente na resolução dos problemas que surgiram pelo caminho. Ao meu coorientador, Dr. Rodrigo Stephani, cuja contribuição foi fundamental para este trabalho e que me ajudou a enxergar a pesquisa também sob a perspectiva da indústria.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPEMIG e FINEP, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste projeto, e à Universidade Federal de Juiz de Fora.

Este documento apresenta o trabalho desenvolvido a partir do projeto de química e tecnologia na área de alimentos em conjunto com o Programa DAI (doutorado acadêmico para inovação) da UFJF. Trabalhamos com o desenvolvimento e a otimização de formulações para leite desnatado UHT, estudamos a fração lipídica do leite de diferentes espécies animais e utilizamos a espectroscopia vibracional para caracterizar e diferenciar leites e queijos Minas Frescal de diferentes origens.

A tese está dividida em três trabalhos. O primeiro trabalho aborda o planejamento de misturas aplicado à otimização das proporções de diferentes sais quelantes (citratos e fosfatos) para aumentar a estabilidade térmica do leite desnatado destinado ao processamento UHT. O segundo trabalho é dedicado ao estudo da fração lipídica de leites de diferentes espécies animais, utilizando espectroscopia vibracional (FTIR e Raman) para caracterizar e comparar seus perfis lipídicos. Por fim, o terceiro trabalho aborda a caracterização físico-química e vibracional de queijos Minas Frescal produzidos por diferentes processos de fabricação. A espectroscopia Raman foi utilizada para diferenciar queijos industriais e artesanais, relacionando as diferenças espectrais principalmente às características da fração lipídica, além de acompanhar as alterações estruturais durante o armazenamento sob refrigeração e à temperatura ambiente.

Portanto, este trabalho teve como objetivo contribuir para a aplicação da espectroscopia vibracional associada à quimiometria na caracterização de diferentes matrizes lácteas, ampliando o entendimento de sua composição e contribuindo para o controle de qualidade de produtos lácteos.

RESUMO

O leite e seus derivados possuem grande relevância nutricional, econômica e tecnológica. Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos capazes de otimizar o processamento, caracterizar sua composição e acompanhar alterações estruturais é importante para o controle de qualidade e para a inovação na indústria de laticínios. Esta tese reúne três estudos voltados à aplicação do planejamento experimental, da espectroscopia vibracional e da quimiometria na investigação de leite e derivados. O primeiro estudo avaliou o efeito combinado de sais estabilizantes sobre a estabilidade coloidal do leite destinado ao processamento UHT. Foi empregado um planejamento de misturas do tipo simplex-centroide para investigar as interações entre citrato de sódio e diferentes fosfatos, utilizando como variáveis-resposta o pH, a concentração de cálcio iônico e a estabilidade térmica. Os resultados mostraram efeito sinérgico entre os sais e permitiram definir uma combinação capaz de aumentar a estabilidade do leite durante o processamento térmico. O segundo estudo teve como objetivo caracterizar a gordura de leites de vaca, cabra, ovelha e búfala. A fração lipídica foi extraída pelo método de Folch e analisada por espectroscopia Raman e no infravermelho, associadas à Análise de Componentes Principais (PCA). As diferenças observadas nos perfis espectrais permitiram diferenciar as espécies animais, demonstrando que a espectroscopia vibracional pode ser utilizada na caracterização da gordura do leite. O terceiro estudo aplicou a espectroscopia Raman associada à PCA para comparar queijos Minas Frescal industriais e artesanais e acompanhar as alterações estruturais durante o armazenamento sob refrigeração e em temperatura ambiente. Os resultados mostraram diferenças entre os processos de fabricação, maior variabilidade entre os queijos artesanais e alterações relacionadas principalmente à organização da fase lipídica e à distribuição de água ao longo do armazenamento. Além disso, o estudo demonstrou a possibilidade de diferenciar queijos Minas Frescal produzidos por diferentes processos utilizando espectroscopia Raman. Em conjunto, os resultados demonstraram que o planejamento experimental, a espectroscopia vibracional e a quimiometria são ferramentas complementares para o estudo de leite e derivados. Essas abordagens permitiram otimizar formulações, caracterizar a gordura de diferentes espécies animais e acompanhar alterações estruturais em queijos Minas Frescal, demonstrando sua aplicação em estudos de caracterização, desenvolvimento de produtos e controle de qualidade.

Palavras-chave: planejamento de misturas; espectroscopia vibracional; quimiometria; gordura do Leite; queijo Minas frescal.

ABSTRACT

Milk and dairy products have great nutritional, economic, and technological importance. In this context, the development of methods to optimize processing, characterize composition, and monitor structural changes is important for quality control and innovation in the dairy industry. This thesis brings together three studies focused on the application of experimental design, vibrational spectroscopy, and chemometrics to the investigation of milk and dairy products. The first study evaluated the combined effect of stabilizing salts on the colloidal stability of milk intended for UHT processing. A simplex-centroid mixture design was employed to investigate the interactions between sodium citrate and different phosphates, using pH, ionic calcium concentration, and heat stability as response variables. The results showed a synergistic effect among the salts and made it possible to define a formulation capable of increasing milk stability during thermal processing. The second study aimed to characterize the milk fat from cow, goat, sheep, and buffalo milk. The lipid fraction was extracted using the Folch method and analyzed by Raman and infrared spectroscopy associated with Principal Component Analysis (PCA). The differences observed in the spectral profiles allowed the differentiation of the animal species, demonstrating that vibrational spectroscopy can be applied to the characterization of milk fat. The third study applied Raman spectroscopy associated with PCA to compare industrial and artisanal Minas Frescal cheeses and to monitor structural changes during storage under refrigeration and at room temperature. The results revealed differences between the manufacturing processes, greater variability among artisanal cheeses, and changes mainly related to lipid phase organization and water distribution throughout storage. In addition, the study demonstrated the possibility of differentiating Minas Frescal cheeses produced by different manufacturing processes using Raman spectroscopy. Overall, the results demonstrate that experimental design, vibrational spectroscopy, and chemometrics are complementary tools for the study of milk and dairy products. These approaches made it possible to optimize formulations, characterize the fat of milk from different animal species, and monitor structural changes in Minas Frescal cheese, demonstrating their application in characterization studies, product development, and quality control.

Keywords: mixture design; vibrational spectroscopy; chemometrics; milk fat; Minas frescal cheese.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Glóbulo de gordura 21
Figura 2 – Estrutura química dos sais quelantes Monofosfato de sódio (MonoP), Difosfato de sódio (DiP), Trifosfato de sódio (TriP) e Citrato de sódio (Cit) utilizados no trabalho 37
Figura 3 – Gráficos de contorno para pH dos leites com adição de sais quelantes (A) leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)..... 50
Figura 4 – Gráficos de contorno para cálcio iônico em mmol L^{-1} dos leites com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)..... 51
Figura 5 – Gráficos de contorno para cálcio iônico em pH = 4 em mmol L^{-1} dos leites com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)..... 53
Figura 6 – Gráficos de contorno para tamanho de partícula dos leites em μm com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)..... 54
Figura 7 – Gráficos de contorno para *heat coagulation time* (HCT) em minutos dos leites com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)..... 55
Figura 8 – Espectros Raman para o leite em pó sem e com adição de sais quelantes, com laser em 1064 nm 59
Figura 9 – Espectros RMNES ^{31}P para o leite em pó e para os leites com adição de mono-, di-, trifosfato e citrato de sódio, liofilizados 61
Figura 10 – (a) *Scores* da PCA dos espectros do leite em pó, e do leite em pó com adição de mono-, di-, trifosfato e citrato de sódio, (b) *loadings* 62
Figura 11– representação da extração lipídica (método de Folch) e separação de fases: etapa de mistura da amostra e solventes (a), banho de gelo durante a separação de fases (b), centrifugação e recuperação da fase orgânica (fase 3) (c) 70
Figura 12 – Espectros infravermelho e Raman (λ_0 = 1064 nm) da Fase 1 após a extração da gordura das 14 amostras de leite das diferentes espécies e diferentes processamentos 74
Figura 13 – Espectros infravermelho e Raman (λ_0 = 1064 nm), da Fase 2 após a extração da gordura das 14 amostras de leite das diferentes espécies e diferentes processamentos 75

Figura 14 – Espectros infravermelho e Raman (λ_0 = 1064 nm) da Fase 3 após a extração da gordura das 14 amostras de leite das diferentes espécies e diferentes processamentos 77
Figura 15 – Espectros Raman e no infravermelho referentes às gorduras extraídas dos leites de vaca, cabra, ovelha e búfala, com laser em 1064 nm 80
Figura 16 – (a) *Scores* da PCA dos espectros Raman das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CE) e vaca (VE); (b) *loadings* da PCA..... 81
Figura 17 – (a) *Scores* da PCA dos espectros Raman das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CL) e vaca (VL); (b) *loadings* da PCA..... 82
Figura 18 – (a) *Scores* da PCA dos espectros no infravermelho das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CE) e vaca (VE); (b) *loadings* da PCA 85
Figura 19 – (a) *Scores* da PCA dos espectros no infravermelho das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CL) e vaca (VL); (b) *loadings* da PCA 86
Figura 20 – Gráfico de barras dos parâmetros físicos dos queijos Minas Frescal: pH, Ca^{2+} (mmol L^{-1}), GT (% m m^{-1}), PT (% m m^{-1}) de queijos industriais (a) e queijos artesanais (b) 96
Figura 21 – PCA dos parâmetros físico-químicos pH, Ca^{2+}, GT, PT de queijos industriais (a) e de queijos artesanais (b)..... 98
Figura 22 – Espectros Raman brutos (λ_0 = 1064 nm) de queijos Minas industriais e artesanais, sem pré-processamento quimiométrico: (a) amostras industriais e (b) amostras artesanais..... 99
Figura 23 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijos Minas industriais (triângulos vermelhos, ▲) vs. artesanais (quadrados azuis, ■), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2 102
Figura 24 – Espectros Raman brutos (λ_0 = 1064 nm), sem pré-processamento quimiométrico, de queijos Minas Frescal durante o armazenamento: (a) queijo industrial e (b) queijo artesanal sob refrigeração, nos dias 1, 3, 7, 30 e 60; e (c) queijo industrial armazenado 104
Figura 25 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijo Minas industrial durante a degradação sob refrigeração (dias 1, 3, 7, 14, 30 e 60), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2 106
Figura 26 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijo Minas artesanal durante a degradação sob refrigeração (dias 1, 3, 7, 14, 30 e 60), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2 109

Figura 27 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijo Minas industrial durante a degradação à temperatura ambiente (meses M1, M2, M3 e M4), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2..... 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de gordura do leite de várias espécies (% em massa dos lipídios totais)..... 22
Tabela 2 – Concentrações e massas molares dos compostos quelantes 40
Tabela 3 – Planejamento experimental para 4 componentes 41
Tabela 4 – Dados físico-químicos para leites controle sem adição de sais quelantes (SM), antes e depois do tratamento térmico (TT) 46
Tabela 5 – Análises físico-químicas das amostras de leite com adição de sais quelantes 46
Tabela 6 – Análises físico-químicas das amostras de leite com adição de sais quelantes e tratamento térmico. 47
Tabela 7 – Ajuste do modelo para cada variável de resposta e os dados estatísticos obtidos ao aplicar a ANOVA dos modelos selecionados. 48
Tabela 8 – Análise de correlação de Pearson entre as variáveis testadas que foram significativas, para o leite com adição de sais e tratamento térmico 56
Tabela 9 – Valores previstos e experimentais para parâmetros de otimização da mistura de sais quelantes 57
Tabela 10 – Tentativa de atribuição das bandas Raman para o leite em pó, com laser em 1064 nm 60
Tabela 11 – Amostras de leite de diferentes espécies e tipos de processamento 68
Tabela 12 – Características físico-químicas dos leites das diferentes espécies e diferentes processamentos 72
Tabela 13 – Tentativa de atribuição das bandas Raman ($\lambda 0$ = 1064 nm) e IV da Fase 1 da extração 74
Tabela 14 – Tentativa de atribuição das bandas Raman ($\lambda 0$ = 1064 nm) e IV da Fase 2 da extração 76
Tabela 15 – Tentativa de atribuição das bandas Raman ($\lambda 0$ = 1064 nm) e IV da Fase 3 da extração 78
Tabela 16 – Atribuições vibracionais sugeridas das bandas Raman observadas em matrizes de queijo Minas Frescal 100
Tabela 17 – Parâmetros físico-químicos de queijos Minas Frescal industriais e artesanais nos dias 1 e 60 de armazenamento refrigerado 112

LISTA DE SIGLAS

AGL – Ácidos graxos livres

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

ATR – *Attenuated Total Reflectance* (Reflectância Total Atenuada)

BU – Leite de búfala cru

CE – Leite de cabra (EMBRAPA)

Cit – Citrato de sódio

CL – Leite de cabra cru (Linhares)

DAG – Diacilgliceróis

DiP – Difosfato de sódio

DOE – *Design of Experiments* (Planejamento de Experimentos)

Dv90 – Diâmetro hidrodinâmico abaixo do qual se encontram 90% das partículas da distribuição.

ETL – Teste de Estabilidade ao Etanol

FC – Fosfatidilcolina

FE – Fosfatidiletanolamina

FS – Fosfatidilserina

FI – Fosfatidilinosito

FIR – *Far-infrared* (Infravermelho distante)

FTIR – *Fourier-transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)

GT – Gordura total

HCT – *Heat Coagulation Time* (Tempo de coagulação térmica)

HTST – *High Temperature Short Time* (Alta temperatura por curto tempo)

IR – *Infrared* (Infravermelho)

LP – Leite em pó

MC – *Mean Centering* (Centramento na Média)

MFGM – *Milk Fat Globule Membrane* (Membrana do glóbulo de gordura do leite)

MIR – *Mid-infrared* (Infravermelho médio)

MonoP – Monofosfato de sódio

Nd:YAG – Granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio (*Neodymium-doped Yttrium Aluminum Garnet*)

NIR – *Near-infrared* (Infravermelho próximo)

OV – Leite de ovelha cru

PC1 – Primeira componente principal

PC2 – Segunda componente principal

PCA – *Principal Component Analysis* (Análise de Componentes Principais)

PLS – *Partial Least Squares* (Mínimos Quadrados Parciais)

PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)

PT – Proteína total

RMNES – Ressonância Magnética Nuclear de Estado Sólido

RSM – *Response Surface Methodology* (Metodologia de Superfície de Resposta)

SIMCA – *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (Modelagem Independente Suave por Analogia de Classes

SM – Sem adição de mistura de sais quelantes

SNV – *Standard Normal Variate* (Variável Normal Padrão)

TAG – Triacilgliceróis

TriP – Trifosfato de sódio

TT – Tratamento térmico

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UHT – *Ultra High Temperature* (Temperatura ultra-alta)

VE – Leite de vaca cru (EMBRAPA)

VL – Leite de vaca cru (Linhares)

WLS – Weighted Least Squares (Mínimos Quadrados Ponderados)

WPNI – *Whey Protein Nitrogen Index* (Índice de Nitrogênio de Proteína do Soro)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE 19

1.1.1 Gorduras 21

1.1.2 Caseínas 23

1.1.3 Minerais 24

1.2 PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE 24

1.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL E QUIMIOMETRIA 26

1.3.1 Espectroscopia no infravermelho 26

1.3.2 Espectroscopia Raman 27

1.3.3 Aplicações das Técnicas Vibracionais no Estudo do Leite e de Seus Componentes 30

1.3.4 Quimiometria 30

1.4 DISPOSIÇÕES GERAIS 31

2 OBJETIVOS GERAIS 33

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 33

2.1.1 Estudo do efeito sinérgico de diferentes fosfatos e citrato de sódio na estabilidade coloidal do leite desnatado sob condições controladas de tratamento térmico severo 33

2.1.2 Estudo espectroscópico vibracional da gordura do leite de diferentes espécies animais pelo método de Folch 34

2.1.3 Espectroscopia Raman associada à quimiometria de queijos Minas frescal artesanais e industriais do Brasil 34

3 ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO DE DIFERENTES FOSFATOS E CITRATO DE SÓDIO NA ESTABILIDADE COLOIDAL DO LEITE DESNATADO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TRATAMENTO TÉRMICO SEVERO 35

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO 35

3.2 METODOLOGIA 39

3.2.1 Preparação das amostras 39

3.2.2 Delineamento experimental 40

3.2.3 Análises Físico-Químicas 41

3.2.3.1 pH 42

3.2.3.2 Determinação dos teores de cálcio iônico e total 42

3.2.3.3 Heat coagulation time (HCT) 42

3.2.3.4 Tamanho de partícula 42

3.2.4 Análises Espectroscópicas 43

3.2.4.1 Espectroscopia Raman 43

3.2.4.2 Espectroscopia no infravermelho 43

3.2.4.3 Ressonância magnética nuclear de sólidos 43

3.2.5 Análise Estatística e Modelagem 44

3.2.6 Modelagem de Regressão para Otimização 44

3.3 RESULTADOS 45

3.3.1 Planejamento de misturas 45

3.3.1.1 pH 49

3.3.1.2 Cálcio Iônico 51

3.3.1.3 Cálcio Iônico em pH = 4 52

3.3.1.4 Distribuição no Tamanho de Partícula 53

3.3.1.5 Heat coagulation time (HCT) 55

3.3.2 Otimização de múltiplos parâmetros 56

3.3.3 Verificação de Modelos Preditivos 58

3.3.4 Liofilização de leite contendo sais quelantes 59

3.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS 63

4 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO VIBRACIONAL DA GORDURA DO LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS PELO MÉTODO DE FOLCH 64

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO 64
4.2 METODOLOGIA 67
4.2.1 Coleta de amostras 67
4.2.1.1 Amostras de Leite Cru 67
4.2.2 Amostras de Leite Processado 68
4.2.3 Análises físico-químicas 69
4.2.3.1 pH 69
4.2.3.2 Determinação dos teores de cálcio 69
4.2.3.3 Determinação do teor de gordura 69
4.2.4 Extração lipídica 70
4.2.5 Análises espectroscópicas 71
4.2.6 Análise estatística 71
4.3 RESULTADOS 72
4.3.1 Caracterização físico-química de diferentes leites 72
4.3.2 Análise Vibracional 73
4.3.3 Análise das componentes principais para as gorduras 79
4.3.3.1 Análise de componentes principais (PCA) dos perfis lipídicos de leites de diferentes espécies por espectroscopia Raman 80
4.3.3.2 Análise de componentes principais (PCA) dos perfis lipídicos de leites de diferentes espécies por espectroscopia no infravermelho 84
4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS 87
5 ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA NA ANÁLISE DE QUEIJOS MINAS FRESCAL ARTESANAIS E INDUSTRIAIS DO BRASIL 89
5.1 REFERENCIAL TEÓRICO 89
5.2 METODOLOGIA 91
5.2.1 Aquisição das Amostras 91

5.2.2 Análise Físico-Química 91

5.2.2.1 Determinação de pH 91

5.2.2.2 Determinação de Cálcio 92

5.2.2.3 Teor de Proteína 92

5.2.2.4 Determinação de Gordura 93

5.2.3 Espectroscopia Raman 93

5.2.4 Estudo dos Diferentes Modos de Produção (Artesanal e Industrial) do Queijo Minas Frescal 93

5.2.5 Estudo da Degradação de Queijos Minas Frescal Refrigerados e à Temperatura Ambiente 94

5.3 RESULTADOS 95

5.3.1 Caracterização Físico-Química de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais 95

5.3.1.1 PCA dos Dados Físico-Químicos de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais 96

5.3.2 Espectroscopia Raman de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais 98

5.3.2.1 PCA dos Espectros Raman de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais 101

5.3.3 Espectroscopia Raman Durante a Degradação de Queijos Minas Frescal 103

5.3.3.1 PCA da Degradação de Queijos Minas Frescal Industriais sob Refrigeração 105

5.3.3.2 PCA da Degradação de Queijos Minas Frescal Artesanais sob Refrigeração 107

5.3.3.3 PCA da Degradação de Queijos Minas Frescal Industriais em Temperatura Ambiente 110

5.3.4 Caracterização Físico-Química da Degradação de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais 112

5.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS 113

6 CONCLUSÕES 115

REFERÊNCIAS 117

APÊNDICE A – DADOS COMPLEMENTARES 127

APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS 131

1 INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico complexo constituído por uma fase aquosa na qual se encontram dispersos lipídios, proteínas, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Os sólidos totais representam, em média, entre 12% e 13% de sua composição, sendo as micelas de caseína e os glóbulos de gordura os principais responsáveis por suas propriedades físico-químicas e pela estabilidade do sistema (Silva, 1997).

De acordo com a legislação brasileira, o termo leite, quando utilizado sem especificação adicional, refere-se ao produto obtido da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias, bem alimentadas e mantidas em boas condições de manejo. Quando proveniente de outras espécies, sua denominação deve indicar a espécie de origem (Brasil, 2017).

O leite é uma das principais matérias-primas da indústria alimentícia e um dos alimentos mais consumidos no mundo. Sua composição reúne proteínas de alto valor biológico, lipídios, lactose, vitaminas e minerais, especialmente cálcio, o que lhe confere elevado valor nutricional. Por outro lado, essa mesma riqueza em nutrientes favorece o crescimento de microrganismos, tornando indispensáveis os tratamentos tecnológicos empregados para garantir sua qualidade, segurança e vida útil (Tamanini *et al.*, 2007).

O comportamento do leite durante o processamento industrial está relacionado à sua composição e às interações entre seus constituintes. Alterações no equilíbrio entre proteínas, sais minerais e gordura podem modificar propriedades importantes, como estabilidade térmica, textura, rendimento industrial e qualidade dos derivados lácteos (Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022). Por isso, compreender a organização estrutural do leite e as transformações que acontecem pelo processamento é essencial para o desenvolvimento de novos produtos e para o aperfeiçoamento dos processos industriais.

Entre as ferramentas utilizadas para análise do leite e seus componentes, destacam-se a espectroscopia vibracional, a quimiometria e o planejamento experimental. A espectroscopia vibracional, quando associada à quimiometria, permite caracterizar alimentos de forma rápida, não destrutiva e com reduzido preparo de amostras, fornecendo informações relevantes sobre sua composição química (Agiomavriti *et al.*, 2024; Mohammadi *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021). Já o planejamento experimental possibilita avaliar simultaneamente diferentes fatores envolvidos em um processo, o que reduz o número de experimentos necessários e aumentando a confiabilidade dos resultados (Buruk Sahin; Aktar Demirtaş; Burnak, 2016; Galvan *et al.*, 2021; Scheffé, 1958). Essas abordagens têm sido empregadas em pesquisas na área de ciência

e tecnologia de alimentos e no desenvolvimento de novos produtos (Adriano *et al.*, 2024; Ferreira, 2022).

Esta tese está organizada em três estudos, voltados ao estudo do leite e de seus derivados. A seção 3 apresenta uma investigação sobre o efeito combinado de diferentes sais estabilizantes na estabilidade coloidal do leite submetido ao processamento térmico, utilizando planejamento de misturas para otimizar as formulações. A seção 4 aborda a caracterização da fração lipídica de leites de diferentes espécies animais por espectroscopia Raman e FTIR, associadas à Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA). A Seção 5 apresenta a caracterização de queijos Minas Frescal artesanais e industriais por espectroscopia Raman, além da avaliação das modificações estruturais observadas durante o armazenamento.

Para fundamentar os estudos desenvolvidos nesta tese, os tópicos a seguir apresentam os principais aspectos gerais relacionados à composição e a estabilidade do leite, às técnicas de espectroscopia vibracional e à quimiometria, que servem de base para a discussão dos resultados apresentados em cada seção.

1.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

A produção e a composição físico-química do leite variam em função de diversos fatores, como espécie, raça, alimentação, estágio de lactação, idade do animal, temperatura ambiente, estação do ano e intervalo entre as ordenhas. Além desses fatores, condições fisiológicas, como a gestação, e patológicas, como a mastite, também influenciam sua composição (Tomassini *et al.*, 2019).

A água é o principal constituinte do leite, representando, em média, 87,1% de sua composição, podendo variar entre 83,5% e 88,7%. A fração sólida corresponde aos sólidos não gordurosos e à gordura do leite. Os sólidos não gordurosos representam entre 7,9% e 10% da massa total e são constituídos principalmente por lactose, proteínas e minerais. Já a gordura apresenta concentração média de 3,6%, podendo variar entre 2,5% e 5,5% (Walstra *et al.*, 2005).

A lactose é o principal carboidrato do leite, correspondendo, em média, a 4,6% de sua composição. As proteínas representam aproximadamente 3,4%, podendo variar entre 2,3% e 4,4%, sendo as caseínas a fração predominante. Os minerais, como cálcio e fósforo, estão presentes em menores concentrações, cerca de 0,7%, variando entre 0,57% e 0,83% (Walstra *et al.*, 2005).

A composição do leite também varia entre diferentes espécies animais (Gantner, 2015). Essas diferenças são mais evidentes no teor e na composição da gordura, bem como na composição das proteínas do leite. Em geral, os leites de búfala e ovelha apresentam maiores teores de gordura quando comparados aos de vaca e cabra. As proteínas também apresentam diferenças entre as espécies, influenciando características como digestibilidade e propriedades tecnológicas. Em contrapartida, a concentração de lactose tende a sofrer menores variações. O perfil de minerais e vitaminas também pode ser diferente entre as espécies, sendo que a quantidade de vitaminas lipossolúveis está diretamente relacionada ao teor de gordura presente no leite (Ong *et al.*, 2021).

As caseínas constituem a principal classe de proteínas do leite e encontram-se organizadas na forma de micelas coloidais. Essas estruturas permanecem estáveis devido às interações eletrostáticas, hidrofóbicas e estéricas entre as proteínas e ao fosfato de cálcio coloidal presente em sua estrutura. Os grupos fosfato das caseínas interagem com íons cálcio e fosfato, contribuindo para a associação das proteínas e para a organização e estabilidade das micelas (Holt *et al.*, 2013).

A estabilidade desse sistema pode ser modificada pela adição de sais estabilizantes, também chamados de sais quelantes, como citrato e fosfatos. Esses compostos alteram o equilíbrio entre as fases solúvel e coloidal do leite, influenciando a concentração de cálcio ionizado e, consequentemente, a estabilidade das micelas, principalmente quando ocorrem variações de pH e temperatura. Quando esse equilíbrio é perturbado, podem ocorrer processos como agregação proteica e gelificação (Nicolais; Chassenieux, 2021).

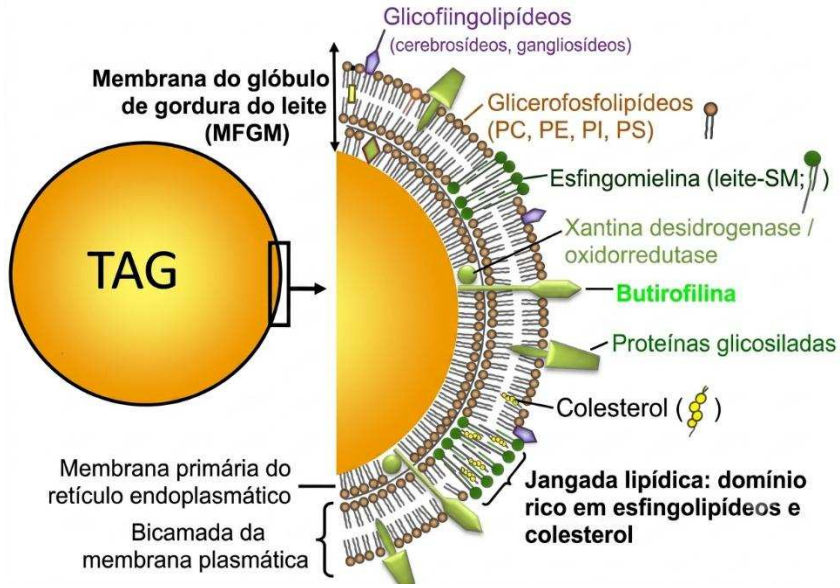
Além das micelas de caseína, o leite contém glóbulos de gordura dispersos na fase aquosa. A interação entre essas duas estruturas é responsável por grande parte das propriedades físico-químicas do leite (Jukkola *et al.*, 2019). Os glóbulos de gordura são revestidos por uma membrana rica em proteínas e fosfolipídios, que contribui para sua estabilidade e para a manutenção da emulsão. Dessa forma, a organização das micelas de caseína, a distribuição dos sais minerais e a estrutura dos glóbulos de gordura estão diretamente relacionadas à estabilidade do leite e ao seu comportamento durante o processamento (Braun; Hanewald; Vilgis, 2019).

Os tópicos a seguir apresentam, de forma mais detalhada, os principais constituintes do leite e sua importância para a composição, a estabilidade e as propriedades tecnológicas desse sistema.

1.1.1 Gorduras

O leite é uma emulsão biológica complexa na qual a fração lipídica desempenha papel fundamental nas propriedades físico-químicas, nutricionais e sensoriais. Essa fração é constituída predominantemente por triacilgliceróis (TAG), que representam cerca de 98% dos lipídios totais, além de componentes minoritários, como fosfolipídios, ácidos graxos livres (AGL), diacilgliceróis, esteróis e vitaminas lipossolúveis (Mendes *et al.*, 2016). Esses lipídios organizam-se na forma de glóbulos de gordura revestidos por uma membrana complexa, denominada membrana do glóbulo de gordura do leite (*Milk Fat Globule Membrane* – MFGM), cujo diâmetro varia aproximadamente de 0,1 a 10 μm e cuja composição também difere entre as espécies animais (Lopez; Cauty; Guyomarc'h, 2019). A variabilidade na composição lipídica entre leites de diferentes mamíferos, como vaca, cabra, ovelha e búfala, está associada a especificidades fisiológicas e metabólicas, influenciando suas características nutricionais, tecnológicas e o valor comercial, além de aumentar a suscetibilidade a adulterações por substituição de matrizes (Lopez; Cauty; Guyomarc'h, 2019). Nesse contexto, a caracterização rápida e precisa da fração lipídica constitui um importante desafio analítico (Amores; Virto, 2019).

Figura 1 – Glóbulo de gordura



Fonte: Adaptado de Lopez *et al.* (2019).

A composição lipídica do leite varia entre as espécies animais, principalmente em relação ao teor de gordura e à distribuição das diferentes classes de lipídios. A Tabela 1 apresenta a composição da gordura do leite de vaca, ovelha, cabra e búfala.

Tabela 1 – Teor de gordura do leite de várias espécies (% em massa dos lipídios totais)

Classe de lipídios	Vaca	Ovelha	Cabra	Búfala
Total %	3,3-4,7	4,0-4,9	4,1-4,5	4,7
Triacilglicerol	97,5	98,1	97,6	98,6
Diacilglicerol	0,36	-	-	0,70
Monoacilglicerol	0,027	0,03	0,10	T
Ésteres de colesterol	T	0,02	0,04	0,1
Colesterol	0,31	-	-	0,3
Ácidos graxos livres	0,27	-	-	0,50
Cole+DAG+AGL	-	1,45	1,89	
Fosfolipídios	0,6	0,38	0,65	0,5

T = traços (< 0,01%); Cole =0 ésteres de colesterol; DAG = diacilgliceróis; AGL = ácidos graxos livres.
Fonte: Adaptado de Amores (2019).

Para a extração da fração lipídica do leite podem ser empregados diferentes métodos baseados em solventes orgânicos, como Rose-Gottlieb, Bligh e Dyer e Folch. Neste trabalho foi utilizado o método de Folch, muito empregado devido à alta eficiência na recuperação de diferentes classes de lipídios (Folch; Lees; Sloane Stanley, 1957; Liu; Moate; Rochfort, 2019).

A fração lipídica obtida pode ser posteriormente caracterizada por espectroscopia Raman e no infravermelho, técnicas que fornecem informações sobre a composição molecular dos lipídios. Associadas à PCA, essas técnicas permitem comparar amostras provenientes de diferentes espécies animais. A caracterização da fração lipídica do leite por espectroscopia vibracional será discutida em maior profundidade na Seção 4.

1.1.2 Caseínas

As caseínas são as principais proteínas do leite e desempenham papel fundamental na estrutura e nas propriedades tecnológicas do leite e de seus derivados. Elas representam cerca de 80% das proteínas totais do leite bovino e encontram-se organizadas na forma de micelas coloidais, estruturas responsáveis por manter a estabilidade do sistema, principalmente durante o processamento térmico (Tsioulpas *et al.*, 2010).

As micelas de caseína são constituídas por quatro frações principais: αs_1-caseína, αs_2-caseína, β-caseína e κ-caseína. Essas proteínas são estabilizadas por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pela presença de fosfato de cálcio coloidal, que estabelece ligações entre resíduos de fosfoserina e contribui para a organização da estrutura micelar (Byun; Hwang; Lee, 2019; Saha *et al.*, 2022).

A estabilidade das micelas é influenciada por fatores como pH, temperatura, força iônica e concentração de sais. Durante a acidificação, ocorre a solubilização do fosfato de cálcio coloidal e a redução da carga elétrica das proteínas, favorecendo a aproximação e a agregação das micelas (Bertsch; Savorani; Fischer, 2019; Saha *et al.*, 2022). À medida que o pH se aproxima do ponto isoelétrico das caseínas, em torno de 4,6, pode ocorrer sua precipitação. Em condições alcalinas, ocorre o efeito contrário: o aumento da carga negativa intensifica a repulsão eletrostática entre as proteínas e modifica o equilíbrio entre as fases micelar e solúvel, favorecendo a dispersão das micelas e reduzindo a turbidez do leite (Gaucheron, 2005; Kern *et al.*, 2020).

A temperatura também interfere na estabilidade das micelas, promovendo a desnaturação de proteínas e alterando a solubilidade dos sais de cálcio (Wang; Ma, 2020). Além disso, a concentração de cálcio e fosfato influencia diretamente as interações entre as proteínas, podendo favorecer a formação de pontes salinas e a agregação das micelas (Ye; Harte, 2013).

Outros fatores também podem alterar a estabilidade desse sistema. Enzimas proteolíticas, como a renina, hidrolisam a κ-caseína, proteína essencial para a estabilidade das micelas, expondo regiões hidrofóbicas que favorecem a coagulação do leite, etapa fundamental na fabricação de queijos. Da mesma forma, a adição de etanol reduz a solubilidade dos sais de cálcio e promove a coagulação das proteínas, princípio utilizado no teste do álcool para avaliação da estabilidade do leite (Liu *et al.*, 2013).

1.1.3 Minerais

Embora estejam presentes em menores concentrações, os minerais desempenham papel importante tanto no valor nutricional quanto nas propriedades tecnológicas do leite. Entre os principais minerais encontram-se cálcio, fósforo, magnésio, sódio e potássio, além de íons como citrato, fosfato e cloreto. Esses componentes interagem entre si e com as proteínas do leite, participando do equilíbrio salino e da estabilidade das micelas de caseína. Alterações nesse equilíbrio podem ser provocadas por fatores como acidificação, tratamento térmico, resfriamento do leite e adição de sais estabilizantes ou agentes quelantes (Cheung, 2015). Podemos destacar o cálcio por exercer papel fundamental na estabilidade do leite. Ele pode ser encontrado na forma livre (cálcio ionizado) ou associado a compostos como citrato e fosfato. A maior parte do cálcio ligado encontra-se na forma de fosfato de cálcio coloidal, componente essencial para a estrutura das micelas de caseína. Além de contribuir para a estabilidade térmica do leite, o cálcio também influencia as propriedades reológicas e de superfície das proteínas. Aproximadamente 66% do cálcio e 55% do fósforo encontram-se na fase coloidal (Gaucheron, 2005).

Além dos macrominerais, o leite também contém elementos-traço, como ferro, cobre, zinco, manganês, selênio, iodo, cromo, cobalto, molibdênio, flúor, arsênio, níquel, silício e boro. Apesar de estarem presentes em menores concentrações, esses elementos contribuem para o valor nutricional do leite e, juntamente com os macrominerais, influenciam a estrutura das proteínas, o processamento e a qualidade dos produtos lácteos (Cheung, 2015; Gaucheron, 2005).

1.2 PRODUTOS DERIVADOS DO LEITE

O leite é uma matéria-prima versátil, e sua composição, rica em proteínas, lipídios, carboidratos e minerais, possibilita a fabricação de diversos produtos lácteos (Fox *et al.*, 2015). Produtos tradicionais como queijos, iogurtes, manteiga, creme de leite e leite fermentado são obtidos por meio de processos como fermentação, coagulação enzimática, desnate, concentração e transformação térmica (Walstra *et al.*, 2005). Além dos produtos tradicionais, tecnologias mais recentes também permitem a produção de leite em pó, leite UHT (*Ultra-high temperature*), bebidas lácteas, fórmulas infantis e ingredientes industriais, como proteínas isoladas, lactose, caseinatos e soro de leite concentrado ou em pó. Essa variedade de produtos

demonstra a versatilidade tecnológica do leite e sua relevância para a alimentação humana, bem como para usos industriais e científicos (Suh, 2022).

Dentre os diversos produtos que o leite pode fornecer, há categorias que são comuns na indústria de laticínios, graças à versatilidade química e funcional de seus componentes. O leite UHT é aquele que passa por um tratamento térmico a temperaturas superiores a 135 °C por um curto período, com o objetivo de eliminar microrganismos e enzimas, garantindo sua estabilidade comercial sem a necessidade de refrigeração (Brasil, 2025; Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022). Foi descrito com mais detalhes na Seção 3, dedicada aos leites submetidos a tratamento térmico, na qual foram investigados os efeitos da adição de diferentes sais quelantes, por meio de um planejamento de misturas, sobre as propriedades físico-químicas e estruturais do leite.

A gordura do leite também é utilizada na produção de manteiga, creme de leite, sorvetes e diversos ingredientes industriais. Sua composição, formada principalmente por triacilgliceróis, fosfolipídios e compostos voláteis, influencia diretamente as propriedades sensoriais e tecnológicas desses produtos (Fox *et al.*, 2015; Walstra *et al.*, 2005). Além disso, variações na composição lipídica entre diferentes espécies animais modificam as propriedades físico-químicas da gordura e podem ser investigadas por técnicas espectroscópicas (Gantner, 2015; Oliveira; Oliveira; Oliveira, 2026). Neste trabalho, a Seção 4 apresenta a caracterização espectroscópica da gordura do leite de diferentes espécies, explorando as diferenças estruturais e composicionais relacionadas à sua origem.

Os queijos constituem um dos principais derivados do leite e podem ser produzidos por diferentes processos tecnológicos. Sua classificação considera critérios como teor de gordura, umidade, tipo de leite e tempo de maturação. De forma geral, a fabricação envolve a coagulação do leite, o corte da coalhada para separação do soro, a moldagem, a salga e, na maioria das variedades, a maturação, etapa responsável pelo desenvolvimento das características de sabor e textura. Entre os principais tipos destacam-se os queijos frescos, como Minas Frescal e Cottage; os maturados, como Parmesão e Gruyère; os de massa filada, como Muçarela e Provolone; e os queijos azuis, como Roquefort e Gorgonzola (Perry, 2004)

Entre esses produtos, o queijo Minas Frescal foi escolhido como objeto de estudo desta tese. Trata-se de um queijo de alta umidade, produzido por coagulação enzimática do leite, com baixo dessoramento, textura macia e sabor suave (Perry, 2004; Silva, 2005). Sua elevada concentração de água torna o produto altamente perecível, exigindo consumo em curto período após a fabricação (Sangaletti *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2019). Essas características fazem do

queijo Minas Frescal um modelo interessante para o estudo das alterações estruturais durante o armazenamento, tema abordado na Seção 5.

1.3 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL E QUIMIOMETRIA

Os tópicos a seguir apresentam os princípios da espectroscopia no infravermelho, da espectroscopia Raman e da quimiometria, destacando suas aplicações na caracterização estrutural e composicional do leite e de seus derivados.

1.3.1 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho baseia-se na absorção de radiação eletromagnética por ligações químicas presentes nas moléculas. Quando a frequência da radiação incidente coincide com a frequência natural de vibração de um grupo funcional, ocorre absorção de energia, promovendo transições entre estados vibracionais. Como cada grupo funcional apresenta frequências vibracionais características, o espectro obtido funciona como uma "impressão digital" molecular, permitindo a identificação da composição química das amostras (Ceniti *et al.*, 2023; Sala, 2008). Classicamente, a absorção no infravermelho ocorre quando há variação periódica do momento de dipolo elétrico durante a vibração molecular. Considerando pequenos deslocamentos em torno da posição de equilíbrio, o momento de dipolo pode ser expresso por uma expansão em série de Taylor,

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{\mathrm{d}\mu}{\mathrm{d}q}\right)_0 q + \cdots \quad \text{Equação 1}$$

em que μ_0 representa o momento de dipolo permanente e q corresponde à coordenada vibracional. Dessa forma, uma vibração será ativa no infravermelho apenas quando houver variação do momento de dipolo durante o movimento vibracional, isto é,

$$\left(\frac{d\mu}{dq}\right)_0 \neq 0 \quad \text{Equação 2}$$

Essa condição constitui a principal regra de seleção para absorção no infravermelho e explica por que moléculas diatômicas homonucleares, cujo momento de dipolo permanece constante durante a vibração, não apresentam atividade nessa região espectral (Pirutin *et al.*, 2023; Sala, 2008). Sob a abordagem da mecânica quântica, a probabilidade de uma transição vibracional é descrita pelo momento de dipolo de transição,

$$\mu_{mn} = \int \psi_m \, \mu \psi_n \, d\tau \quad \text{Equação 3}$$

em que ψ_m e ψ_n representam as funções de onda dos estados inicial e final. Para que uma transição seja permitida, o momento de transição deve ser diferente de zero e obedecer às regras de seleção vibracionais. No caso do oscilador harmônico, a principal regra de seleção é:

$$\Delta v = \pm 1$$

A espectroscopia no infravermelho compreende três regiões espectrais: infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e infravermelho distante (FIR). Dentre essas, a região do infravermelho médio, compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} (2500 - 25000 nm), é a mais utilizada para caracterização molecular, pois concentra as vibrações fundamentais da maioria das moléculas orgânicas e permite a identificação de diferentes grupos funcionais (Ceniti *et al.*, 2023; Mohammadi *et al.*, 2024)

Além do caráter não destrutivo, a espectroscopia no infravermelho apresenta como vantagens a rapidez de aquisição dos espectros, a necessidade mínima de preparo das amostras e a possibilidade de obtenção simultânea de informações sobre diferentes constituintes químicos (Mazurek *et al.*, 2015; Mohammadi *et al.*, 2024). Em especial, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tornou-se uma das principais ferramentas analíticas empregadas na indústria de laticínios para determinação da composição do leite e derivados, bem como na avaliação da qualidade, autenticidade e detecção de adulterações. Quando associada a métodos quimiométricos, a técnica apresenta elevada capacidade para classificação e predição de propriedades físico-químicas, ampliando significativamente seu potencial analítico (Ceniti *et al.*, 2023; Mazurek *et al.*, 2015; Windarsih *et al.*, 2021).

1.3.2 Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi previsto teoricamente por Adolf Smekal em 1923 e observado experimentalmente por Chandrasekhara Venkata Raman e K. S. Krishnan em 1928. Dois anos depois, Raman recebeu o Prêmio Nobel de Física pela descoberta desse fenômeno, que deu origem à espectroscopia Raman (Chandra *et al.*, 2024). Atualmente, essa técnica é amplamente empregada na caracterização estrutural de materiais devido à sua elevada especificidade química, rapidez de análise, reduzido preparo de amostras e caráter não destrutivo, sendo aplicada em áreas como ciência dos alimentos, biologia, química e ciência dos materiais (Beć *et al.*, 2020; Chandra *et al.*, 2024).

Assim como a espectroscopia no infravermelho, a espectroscopia Raman é uma técnica vibracional capaz de fornecer informações sobre a estrutura molecular por meio dos modos normais de vibração. Entretanto, os princípios físicos responsáveis pela geração dos espectros são distintos. Enquanto a espectroscopia no infravermelho baseia-se na absorção da radiação eletromagnética policromática, a espectroscopia Raman fundamenta-se no espalhamento inelástico da luz monocromática, normalmente proveniente de um laser (Beć *et al.*, 2020; Sala, 2008).

Quando um feixe de luz monocromática incide sobre uma molécula, a maior parte da radiação é espalhada sem alteração de energia, fenômeno denominado espalhamento Rayleigh. Apenas uma pequena fração dos fótons excita os modos vibracionais da molécula, ocorrendo troca de energia entre a radiação incidente e o sistema molecular. Como consequência, a radiação espalhada apresenta frequência diferente da radiação incidente, caracterizando o espalhamento Raman (Mohammadi *et al.*, 2024; Sala, 2008).

A principal diferença entre a espectroscopia Raman e a espectroscopia no infravermelho está no mecanismo de interação entre a radiação e a matéria. Na absorção no infravermelho, uma vibração molecular será observada quando houver variação do momento de dipolo elétrico durante a vibração. No Raman, por outro lado, a interação depende da deformação da nuvem eletrônica provocada pelo campo elétrico da radiação incidente, gerando um momento de dipolo induzido (Mendes *et al.*, 2016; Sala, 2008) equação 4:

$$\mathrm{P} = \alpha \mathrm{E} \quad \text{Equação 4}$$

em que P representa o momento de dipolo induzido, α corresponde à polarizabilidade molecular e E é o campo elétrico da radiação incidente.

Como a polarizabilidade sofre pequenas variações durante a vibração molecular, ela pode ser expandida em série de Taylor em torno da posição de equilíbrio:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \cdots \text{ Equação 5}$$

Desprezando-se os termos de ordem superior, verifica-se que um modo vibracional somente será ativo no Raman quando ocorrer variação da polarizabilidade ao longo da vibração, ou seja,

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0 \text{ Equação 6}$$

Essa expressão constitui a regra de seleção da espectroscopia Raman e evidencia sua principal diferença em relação à espectroscopia no infravermelho, cuja atividade vibracional depende da condição observada na equação 2.

Dessa forma, enquanto a espectroscopia no infravermelho apresenta maior sensibilidade a vibrações associadas a grupos funcionais polares, a espectroscopia Raman é particularmente sensível a ligações covalentes pouco polares e a estruturas de elevada simetria. Em produtos lácteos, essa complementaridade permite obter informações moleculares distintas sobre proteínas, lipídios e demais constituintes da matriz. Além disso, a espectroscopia Raman pode apresentar vantagens em sistemas aquosos, uma vez que a água possui menor contribuição espectral nessa técnica, e possibilita a análise de amostras com menor necessidade de preparo. Por outro lado, a fluorescência de alguns componentes da matriz pode interferir nas medidas Raman, enquanto a elevada absorção de água pode limitar determinadas aplicações no infravermelho. Assim, a espectroscopia Raman pode ser particularmente adequada para a caracterização da fração lipídica e para o monitoramento de alterações estruturais em matrizes lácteas complexas, enquanto Raman e FTIR podem ser empregadas de forma complementar para ampliar a caracterização molecular dos produtos (Beć *et al.*, 2020; Sala, 2008).

O espalhamento Raman pode originar três componentes espectrais. O espalhamento Rayleigh corresponde ao processo elástico, no qual não ocorre troca de energia entre o fóton e a molécula. Já o espalhamento Stokes ocorre quando parte da energia do fóton incidente é transferida para a molécula, produzindo um fóton espalhado de menor energia. No espalhamento anti-Stokes, a molécula encontra-se inicialmente em um estado vibracional excitado e transfere energia ao fóton espalhado, que passa a apresentar energia superior à radiação incidente (Chandra *et al.*, 2024; Pirutin *et al.*, 2023). Como, à temperatura ambiente, a maior parte das moléculas ocupa o estado vibracional fundamental, as bandas Stokes

apresentam intensidade significativamente maior que as bandas anti-Stokes e, por isso, são as mais utilizadas em análises espectroscópicas (Mohammadi *et al.*, 2024; Sala, 2008).

1.3.3 Aplicações das Técnicas Vibracionais no Estudo do Leite e de Seus Componentes

As técnicas de espectroscopia vibracional têm sido amplamente utilizadas na caracterização de sistemas lácteos, permitindo investigar a composição química e as alterações estruturais do leite e de seus derivados (Silva *et al.*, 2021). Entre essas técnicas, a espectroscopia Raman e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) apresentam características complementares, sendo empregadas na avaliação de proteínas, lipídios e outros constituintes da matriz láctea, bem como na diferenciação entre espécies animais, na caracterização de produtos lácteos e no monitoramento de alterações decorrentes do processamento e do armazenamento (Oliveira, 2026).

A espectroscopia Raman apresenta elevada sensibilidade às vibrações das ligações C-H e C=C, características da fração lipídica (Czamara *et al.*, 2015). Já a FTIR é mais sensível às vibrações de grupos funcionais polares, permitindo obter informações sobre proteínas, lipídios e carboidratos presentes no leite. Além disso, a espectroscopia Raman apresenta baixa interferência da água, característica vantajosa para a análise de leite e derivados com elevado teor de umidade (Pirutin *et al.*, 2023; Zhang; Jiang; Xiong, 2023).

Associadas à Análise de Componentes Principais (PCA) e a outras ferramentas quimiométricas, essas técnicas permitem explorar grandes conjuntos de dados espectrais, identificar padrões de similaridade entre amostras e evidenciar diferenças relacionadas à composição, ao processamento e à origem dos produtos. Dessa forma, a espectroscopia vibracional constitui uma ferramenta importante para a caracterização, diferenciação e o controle de qualidade de leite e derivados.

1.3.4 Quimiometria

A quimiometria consiste na aplicação de métodos estatísticos e matemáticos ao planejamento experimental e à análise de dados químicos. Na espectroscopia vibracional, essas ferramentas são fundamentais, uma vez que cada amostra gera espectros contendo um grande

número de variáveis, cuja interpretação pode ser complexa. Dessa forma, a quimiometria permite identificar padrões, tendências e diferenças entre as amostras, facilitando a interpretação dos dados (Ferreira, 2022).

Entre as diferentes abordagens quimiométricas, o Planejamento de Experimentos (*Design of Experiments* - DOE) é amplamente utilizado para investigar o efeito de múltiplos fatores sobre uma resposta de interesse. Além de reduzir o número de experimentos necessários, essa estratégia possibilita avaliar simultaneamente os efeitos individuais e as interações entre os fatores estudados (Adriano *et al.*, 2024). Neste trabalho, o DOE foi aplicado na Seção 3, por meio de um planejamento de misturas com quatro componentes, para avaliar a influência de diferentes fosfatos e do citrato de sódio sobre a estabilidade coloidal do leite destinado ao processamento UHT.

Outra técnica amplamente empregada em quimiometria é a PCA. Trata-se de um método não supervisionado que reduz a dimensionalidade dos dados ao transformar variáveis correlacionadas em componentes principais, responsáveis por descrever a maior parte da variabilidade existente no conjunto de dados (Jolliffe, 1986). De modo geral, a PCA facilita a visualização de agrupamentos entre amostras e auxilia na interpretação das principais diferenças observadas entre os espectros.

1.4 DISPOSIÇÕES GERAIS

Na seção 3 desta tese, o planejamento de misturas foi empregado para avaliar a influência da combinação de diferentes fosfatos e do citrato de sódio na estabilidade coloidal do leite desnatado que passa por tratamento térmico severo. A partir desse estudo foi possível investigar a interação entre os componentes da mistura e chegar a uma combinação adequada às condições estudadas.

Em sequência, foi investigada a fração lipídica de leites provenientes de diferentes espécies animais por espectroscopia Raman e FTIR. A interpretação dos espectros por meio da PCA permitiu caracterizar as amostras e identificar diferenças entre os perfis espectrais de acordo com a espécie de origem.

Por fim, foi realizado o estudo de queijos Minas Frescal industriais e artesanais, comparando suas características espectroscópicas e físico-químicas ao longo do armazenamento sob refrigeração e à temperatura ambiente. A espectroscopia Raman, associada

à PCA, foi empregada para acompanhar as alterações estruturais observadas durante o armazenamento e diferenciar os queijos de acordo com o tipo de produção.

Em conjunto, os estudos que serão apresentados contribuem para ampliar o conhecimento sobre a relação entre composição, estrutura e processamento de leite e derivados, demonstrando o potencial do planejamento experimental, da espectroscopia vibracional e da quimiometria como ferramentas aplicadas à pesquisa, ao desenvolvimento de produtos e ao controle de qualidade na indústria de laticínios.

2 OBJETIVOS GERAIS

Aplicar técnicas de espectroscopia vibracional associadas à quimiometria na caracterização e diferenciação de sistemas lácteos diversos mediante modificações em sua composição e em suas propriedades físico-químicas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para facilitar a leitura, os objetivos específicos foram estruturados em três seções, cada qual referente a cada um deles.

2.1.1 Estudo do efeito sinérgico de diferentes fosfatos e citrato de sódio na estabilidade coloidal do leite desnatado sob condições controladas de tratamento térmico severo

- Realizar o planejamento de misturas de 4 componentes (citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio e trifosfato de sódio) isolados e misturas a fim de se otimizar a quantidade dessas misturas;
- Estudar os efeitos da adição de diferentes sais estabilizantes em diferentes concentrações no leite, avaliando o efeito dos estabilizantes separadamente e de suas misturas.
- Avaliar as influências dos aditivos a partir da espectrometria Raman e por ressonância magnética nuclear do estado sólido do núcleo de ^{31}P.
- Estudar a relação entre a adição de sais estabilizantes e o cálcio presente no leite através das análises dos teores cálcio iônico e total nos produtos formulados;
- Estudar a estabilidade térmica dos produtos formulados através do *heat coagulation time* (HCT);
- Estudar o efeito da adição dos sais estabilizantes na distribuição do tamanho das partículas através da análise de tamanho de partículas por difração a laser (LS).

2.1.2 Estudo espectroscópico vibracional da gordura do leite de diferentes espécies animais pelo método de Folch

- Realizar a extração da fração lipídica de leites crus de vaca, cabra, ovelha e búfala, bem como de leites pasteurizados e UHT de vaca e cabra, utilizando a metodologia de Folch;
- Analisar as diferenças entre as fases obtidas na extração, utilizando as técnicas espectroscópicas para uma avaliação da eficiência do método e da pureza da fração lipídica isolada;
- Caracterizar as gorduras extraídas por meio de espectroscopia Raman e infravermelho, visando identificar possíveis diferenças entre as amostras;
- Aplicar análise de componentes principais (PCA) para classificar as amostras de leite cru de acordo com a espécie animal e verificar se a fração lipídica isolada é consistente entre diferentes extrações.

2.1.3 Espectroscopia Raman associada à quimiometria de queijos Minas frescal artesanais e industriais do Brasil

- Caracterizar queijos Minas Frescal artesanais e industriais por meio de espectroscopia Raman;
- Avaliar as alterações estruturais dos queijos durante o armazenamento refrigerado e em condição de temperatura ambiente;
- Identificar as principais bandas espectrais associadas às modificações estruturais decorrentes do armazenamento, com ênfase na fração lipídica;
- Aplicar a PCA para diferenciar queijos artesanais e industriais;
- Correlacionar as informações espectroscópicas com as alterações físico-químicas observadas durante o período de armazenamento.

3 ESTUDO DO EFEITO SINÉRGICO DE DIFERENTES FOSFATOS E CITRATO DE SÓDIO NA ESTABILIDADE COLOIDAL DO LEITE DESNATADO SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE TRATAMENTO TÉRMICO SEVERO

Está seção apresenta o embasamento teórico e metodológico para a avaliação da estabilidade coloidal do leite submetido ao tratamento térmico severo e à adição de agentes quelantes. Inicialmente, é apresentada uma revisão da literatura sobre a composição do leite, os efeitos do processamento térmico no equilíbrio salino e na estrutura das micelas de caseína, bem como a atuação dos sais quelantes de cálcio na redução de fenômenos de instabilidade. Em seguida, são abordados os fundamentos do Planejamento de Misturas aplicado a misturas, ferramenta utilizada neste estudo para avaliar e otimizar as interações entre os diferentes fosfatos e o citrato de sódio no sistema lácteo.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O leite cru apresenta riscos à saúde pública devido à sua suscetibilidade à contaminação por microrganismos patogênicos e à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA), que podem ser graves e afetam a qualidade do leite. Para minimizar esses riscos, o leite cru é submetido a tratamentos térmicos destinados a eliminar patógenos presentes, como *Salmonella, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157* e *Staphylococcus aureus* (Crotta *et al.*, 2016). Existem dois principais tipos de tratamento térmico aplicados ao leite: pasteurização e ultrapasteurização (Alegbeleye *et al.*, 2018). A pasteurização consiste no aquecimento do leite a temperaturas inferiores às empregadas no processamento UHT, por tempo suficiente para eliminar microrganismos patogênicos e reduzir a carga microbiana, preservando grande parte de suas características originais (Tadjine *et al.*, 2020). Já a ultrapasteurização submete o leite a temperaturas superiores a 135 °C por poucos segundos, seguida de envase asséptico, permitindo a obtenção de um produto comercialmente estéril e estável à temperatura ambiente (Fox; Uibel; Harris, 2007; Walstra *et al.*, 2005). O tratamento térmico do leite, essencial para garantir a segurança alimentar, provoca alterações em sua composição (Bueno *et al.*, 2020).

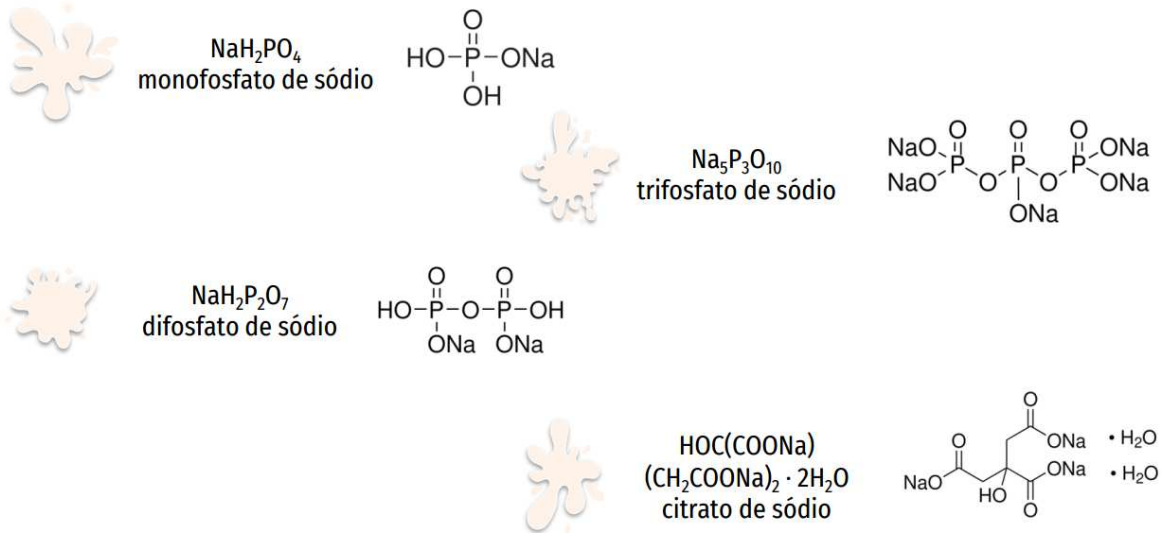
A desnaturação das proteínas, pode afetar a viscosidade e a capacidade de coagulação do leite. A formação de complexos entre as proteínas do soro e a caseína pode levar à turvação ou à formação de sedimentos (Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022). As alterações no equilíbrio

salino, causadas pela dissociação de sais e pela formação de novos complexos, podem resultar na instabilidade das micelas de caseína e na formação de gel (Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022; Singh, 2004). O aquecimento intenso pode causar alterações irreversíveis, como a agregação das micelas de caseína, afetando a textura e a aparência do produto final. A intensidade do tratamento térmico deve ser compatível com o produto desejado e com sua vida útil, sendo necessário minimizar as alterações físico-químicas induzidas pelo aquecimento para preservar a qualidade nutricional, sensorial e tecnológica do leite (Bueno *et al.*, 2020; Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022).

Entre as propriedades mais importantes para o processamento térmico destaca-se a estabilidade térmica do leite (ETL), que corresponde à resistência do leite à coagulação ou gelificação visível durante o aquecimento e constitui um importante parâmetro para o processamento de produtos lácteos. A estrutura micelar das caseínas desempenha um papel central na estabilidade térmica do leite. Os principais fatores que influenciam a ETL incluem o equilíbrio salino, o teor natural de ureia, o pH, a estabilidade das micelas de caseína, o período de lactação, a nutrição do gado, a presença de mastite, bem como o tempo e a temperatura de processamento. A interação entre esses fatores determina o comportamento do leite durante o aquecimento e sua estabilidade frente ao tratamento térmico (Singh, 2004).

Para mitigar problemas como a instabilidade, sedimentação e gelificação, que afetam a vida de prateleira do leite, a adição de quelantes como citratos e fosfatos tem sido amplamente utilizada. Alguns desses sais quelantes são permitidos pela legislação e incluem citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio e trifosfato de sódio, os quais podem ser adicionados individualmente ou em combinação, com a dosagem máxima permitida de 0,1 g/100 mL (Brasil, 2025). Esses compostos são incorporados ao leite para aumentar sua estabilidade térmica.

Figura 2 – Estrutura química dos sais quelantes Monofosfato de sódio (MonoP), Difosfato de sódio (DiP), Trifosfato de sódio (TriP) e Citrato de sódio (Cit) utilizados no trabalho



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Os agentes quelantes de cálcio contribuem para o aumento da estabilidade térmica do leite, pois sequestram o cálcio iônico, diminuindo sua disponibilidade e, ao mesmo tempo, interagem com a caseína para estabilizar as micelas, prevenindo a precipitação. A adição de quelantes de cálcio promove uma redução na turbidez e um aumento da viscosidade, devido à solubilização das proteínas (Renhe; Indris; Corredig, 2018; Renhe; Zhao; Corredig, 2019).

A adição de sais sequestrantes de cálcio aos sistemas lácteos é amplamente utilizada na indústria de laticínios para diferentes propósitos, como melhorar a estabilidade térmica e prevenir a sedimentação no leite UHT ou para ajustar propriedades físicas do queijo processado, como a capacidade de derretimento e a textura. Esses sais alteram o equilíbrio mineral nos sistemas lácteos, modificando a distribuição do cálcio entre as fases coloidal e solúvel. Ao sequestrar íons de cálcio livres, podem também interagir com o cálcio do fosfato de cálcio micelar, comprometendo a integridade da micela. No entanto, o impacto dos sequestrantes sobre a estrutura micelar varia, assim como sua capacidade de interagir com íons de cálcio e proteínas micelares (Garcia; Alting; Huppertz, 2023).

A escolha dos estabilizantes apropriados é um processo complexo, uma vez que são considerados eficazes quando conseguem reduzir o cálcio ionizado de forma moderada, sem provocar um aumento excessivo do pH, o que poderia causar escurecimento antes, durante e após o tratamento térmico e o armazenamento. Dado que o cálcio desempenha um papel fundamental na estabilidade coloidal do leite, é essencial compreender como ele está distribuído entre as fases solúvel e coloidal (Tsioulpas *et al.*, 2010) e avaliar a influência da adição de

fosfatos e citrato de sódio nessa distribuição. Diversos estabilizantes têm sido investigados com o objetivo de minimizar a sedimentação, além de reduzir o espessamento e a coagulação induzida pelo calor em leites concentrados (Boumpa *et al.*, 2008).

Considerando que o efeito dos sais quelantes depende das proporções em que são utilizados, o planejamento de misturas é uma abordagem adequada para investigar esse tipo de sistema. No presente estudo, essa metodologia foi empregada para avaliar combinações de quatro sais quelantes permitidos pela legislação brasileira. Os fundamentos teóricos dessa abordagem são apresentados a seguir.

A metodologia de DOE constitui uma abordagem estatística utilizada para planejar experimentos, construir modelos matemáticos e otimizar processos. Entre suas aplicações, o Planejamento de Misturas é usado em situações nas quais a resposta depende das proporções dos componentes da formulação, e não da quantidade absoluta de cada um deles (Buruk Sahin; Aktar Demirtaş; Burnak, 2016; Scheffé, 1958).

Nos experimentos com misturas, as proporções dos componentes estão relacionadas pela restrição de que sua soma deve ser igual à unidade ($\sum x_i = 1$). Essa característica diferencia esse tipo de planejamento dos delineamentos fatoriais convencionais e faz com que a região experimental seja representada geometricamente por um simplex, uma figura geométrica cujos vértices representam as formulações constituídas por componentes puros e cujos pontos internos correspondem às diferentes combinações entre eles. A dimensão do simplex depende do número de componentes da mistura (Coscione; Andrade; May, 2005; Scheffé, 1958).

Entre os delineamentos mais utilizados destacam-se os planejamentos simplex-*lattice* e simplex-centroide. O simplex-*lattice* distribui os pontos experimentais uniformemente ao longo da região experimental, sendo o número de ensaios definido em função do número de componentes e do grau do modelo polinomial adotado. Já o simplex-centroide inclui os vértices do simplex, os pontos médios das arestas e o centróide da região experimental, permitindo avaliar os efeitos das proporções dos componentes e das interações entre eles (Buruk Sahin; Aktar Demirtaş; Burnak, 2016; Scheffé, 1958).

Após a definição do delineamento experimental, os dados são ajustados por modelos polinomiais específicos para misturas, conhecidos como modelos canônicos de Scheffé. Esses modelos podem ser lineares, quadráticos ou cúbicos especiais, sendo escolhidos de acordo com a complexidade do sistema e a qualidade do ajuste obtido (Coscione; Andrade; May, 2005).

Em aplicações práticas, é comum que existam limites mínimos ou máximos para a proporção de cada componente da mistura, restringindo a região experimental. Nesses casos, emprega-se a transformação em pseudocomponentes, que reescalona a região viável sem alterar

as relações entre os componentes, permitindo a aplicação dos delineamentos clássicos de misturas dentro da faixa de interesse (Cornell, 2002). Esse procedimento também possibilita adaptar os modelos de misturas a condições experimentais com restrições de formulação (Bezerra *et al.*, 2020). Outra estratégia consiste em transformar as proporções da mistura em variáveis matematicamente independentes, permitindo combinar delineamentos de superfície de resposta com variáveis de processo, como temperatura e tempo (Azcarate; Pinto; Goicoechea, 2020; Oliveira *et al.*, 2026).

Dessa forma, o Planejamento de Misturas fornece uma estrutura estatística para investigar o efeito da composição sobre uma ou mais respostas, permitindo reduzir o número de experimentos, ajustar modelos matemáticos e determinar a combinação de componentes que resulta no desempenho desejado. Nesta tese, o planejamento de misturas foi aplicado para otimizar combinações de sais estabilizantes empregadas em leite submetido a tratamento térmico severo, com o objetivo de aumentar sua estabilidade durante o processamento.

3.2 METODOLOGIA

Nesta seção são apresentados os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, incluindo a preparação das amostras, o delineamento experimental, as análises físico-químicas e as análises espectroscópicas. As metodologias descritas permitiram avaliar os efeitos da adição de sais quelantes sobre a estabilidade coloidal do leite e caracterizar as amostras por espectroscopia Raman, infravermelho e ressonância magnética nuclear de estado sólido.

3.2.1 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas a partir de leite em pó desnatado comercial (Land O'Lakes, Inc., Arden Hills, MN, EUA), com uma composição de 0,74% de gordura, 3,28% de umidade, 38,63% de proteína e um índice de nitrogênio de proteína do soro (WPNI) de 7,80 mg/g. O uso de leite em pó desnatado garantiu a consistência composicional e melhorou a reprodutibilidade experimental entre os lotes independentes. Duas preparações independentes de leite reconstituído foram produzidas no mesmo dia, e todos os experimentos foram realizados utilizando ambas as preparações. O pó foi reconstituído em água deionizada a 22 ± 2 °C até atingir 9% (m/m) de sólidos totais. A solução reconstituída foi mantida sob refrigeração (8 °C) por 24 horas para garantir a solubilização completa do pó e a hidratação das proteínas.

Após esse período, a solução foi caracterizada utilizando um analisador ultrassônico portátil de leite (Ekomilk, Capítulo Lab, São Paulo, Brasil), obtendo-se os seguintes valores médios: gordura 0,28 ± 0,07%, sólidos não gordurosos 9,11 ± 0,58%, densidade 1,035 ± 0,002 g/mL, proteína 3,55 ± 0,22% e lactose 4,88 ± 0,31%. A partir do leite reidratado, os sais quelantes citrato de sódio (Cit), monofosfato de sódio (MonoP), difosfato de sódio (DiP) e trifosfato de sódio (TriP) foram adicionados na forma de pós secos, de acordo com as proporções e concentrações definidas pelo delineamento experimental. Após a adição, as amostras foram mantidas sob agitação constante por 10 minutos para garantir a completa dissolução. As concentrações de fosfato foram ajustadas para cumprir o limite máximo permitido pela legislação brasileira (Portaria MAPA nº 783/2025), que é de 0,1 g/100 mL expresso como P_2O_5. Embora o citrato de sódio seja classificado como *quantum satis* pela mesma regulamentação, sua concentração máxima neste estudo também foi fixada em 0,1 g/100 mL para garantir uma comparação direta com os demais sais quelantes. Após a adição dos sais, as amostras foram submetidas a tratamento térmico em banho de óleo a 155 °C por 8 minutos (Campos *et al.*, 2025) e, em seguida, resfriadas em banho de gelo até a temperatura ambiente (22 ± 2 °C). As concentrações e massas molares dos sais podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações e massas molares dos compostos quelantes

Concentrações	Cit	MonoP	DiP	TriP
%m/m (P_2O_5)	-	0,1	0,1	0,1
%m/m	0,1	0,169	0,157	0,173
mmol L^{-1}	3,400	14,085	7,051	4,703
g mol^{-1}	294,10	119,98	221,94	367,86

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

3.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi conduzido de acordo com a abordagem de mistura simplex-centroide para quatro componentes, correspondentes ao citrato (X_1), monofosfato (X_2), difosfato (X_3) e trifosfato (X_4). As proporções testadas, apresentadas na Tabela 3, variaram entre 0 e 1, com a condição de que a soma das frações fosse igual a 1 ($0 \leq X_i \leq 1, \sum X_i = 1$). Para garantir a estimativa do erro experimental, repetições independentes foram realizadas no ponto central do delineamento (25% de cada componente), enquanto as demais formulações seguiram

as combinações definidas pelo modelo (Cornell, 2002; Jolliffe, 1986; Zhou *et al.*, 2017). Análises Físico-Químicas das amostras consistiram na medição do pH, determinação dos teores de cálcio iônico e total, análise do tamanho de partícula e avaliação do tempo de coagulação térmica (*Heat Coagulation Time* - HCT). Cada determinação analítica foi realizada em duplicata para ambas as amostras preparadas de forma independente a 22 ± 2 °C.

Tabela 3 – Planejamento experimental para 4 componentes

N° exp	Cit	MonoP	DiP	TriP
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1
5	0,5	0,5	0	0
6	0,5	0	0,5	0
7	0,5	0	0	0,5
8	0	0,5	0,5	0
9	0	0,5	0	0,5
10	0	0	0,5	0,5
11	0,33	0,33	0,33	0
12	0,33	0,33	0	0,33
13	0,33	0	0,33	0,33
14	0	0,33	0,33	0,33
15	0,25	0,25	0,25	0,25
16	0,625	0,125	0,125	0,125
17	0,125	0,625	0,125	0,125
18	0,125	0,125	0,625	0,125
19	0,125	0,125	0,125	0,625

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

3.2.3 Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas incluíram pH, teores de cálcio iônico e total, tamanho de partícula e tempo para coagulação (HCT).

3.2.3.1 pH

Para determinar a acidez das amostras, o pH foi medido à temperatura ambiente. Foi utilizado um medidor de pH digital, modelo PG1400 (fabricante Gehaka, São Paulo), que foi previamente calibrado com soluções de referência com pH 4,0 e 7,0.

3.2.3.2 Determinação dos teores de cálcio iônico e total

De acordo com Singh *et al.* (2019), para análise de teores de cálcio iônico e cálcio total foram utilizados o medidor de íons cálcio LAQUAtwin (Horiba Instruments). O medidor de íons cálcio foi calibrado usando soluções padrões de cálcio de 3,74 mM (150 ppm) e 49,90 mM (2000 ppm) antes de cada experimento. Para a determinação do cálcio iônico, uma pequena alíquota da amostra foi adicionada diretamente no sensor do equipamento para leitura. Já para a determinação do cálcio total, a amostra foi acidificada até pH 4,0 com ácido clorídrico e, em seguida, uma pequena alíquota foi adicionada diretamente no sensor do equipamento para leitura. As medidas serão realizadas em duplicata à temperatura ambiente.

3.2.3.3 Heat coagulation time (HCT)

O tempo de coagulação térmica (HCT) foi determinado a 155 °C utilizando um banho de óleo com temperatura controlada. Essa temperatura foi selecionada para fornecer um tratamento térmico severo padronizado para avaliação laboratorial comparativa. O método, descrito por Singh (2019), consiste na imersão de um frasco de vidro contendo 10 mL de amostra em um banho de óleo com temperatura controlada equipado com um agitador. O HCT é o tempo decorrido entre a colocação da amostra no banho e os primeiros sinais visíveis de coagulação. O HCT determinado nessas condições representa um parâmetro em escala laboratorial da coagulação induzida pelo calor e não deve ser interpretado como um preditor direto da estabilidade térmica industrial.

3.2.3.4 Tamanho de partícula

Para a análise da distribuição do tamanho das partículas, foi utilizado o analisador de partículas por difração a laser LS 13320 (Beckman Coulter, Califórnia, EUA), equipado com

módulo de dispersão em meio aquoso. As amostras foram adicionadas lentamente e diretamente ao reservatório do equipamento até atingir uma obscurescência entre 1% e 3%. Para o cálculo dos resultados, foram adotados índices de refração de 1,332 para o dispersante (água) e 1,57 para as micelas de caseína. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Beckman Coulter, versão 5.03. Os resultados foram expressos como Dv90, correspondente ao diâmetro hidrodinâmico abaixo do qual se encontram 90% das partículas da distribuição. As análises foram realizadas em duplicata, à temperatura ambiente.

3.2.4 Análises Espectroscópicas

A partir do leite em pó de baixo tratamento térmico (low heat), reidratado para 9% de sólidos, foram separadas 5 amostras: leite sem adição dos sais, leite com adição de monofosfato, difosfato e trifosfato de sódio, todos adicionados na concentração de 0,1 g/ 100 mL expressas em P_2O_5 e adição de citrato de sódio na concentração de 0,1 g/ 100 mL. Ambas as amostras passaram pelo processo de liofilização, para posteriores análises Raman, RMNES do núcleo de ^{31}P e quimiométricas. Nesta parte do trabalho o leite não passou por tratamento térmico.

3.2.4.1 Espectroscopia Raman

As análises dos leites foram registradas em instrumento FT-Raman Bruker MultiRAM, com laser Nd:YAG operando a 1064 nm, com resolução espectral de 4 cm^{-1}, com faixa espectral de 4000 a 50 cm^{-1}, potência de laser de 500 mW e 512 scans.

3.2.4.2 Espectroscopia no infravermelho

As amostras foram analisadas em um espectrômetro FTIR Bruker Vertex 70v, equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) de diamante. Os espectros foram registrados de 4000 a 400 cm^{-1} com 256 scans, a uma resolução de 4 cm^{-1}.

3.2.4.3 Ressonância magnética nuclear de sólidos

As misturas passaram pelo processo de liofilização através do liofizador FreeZone 2,5 Litros Sistema de liofilização de bancada com PTFE -coletor revestido, e após esse processo

foram analisadas pelo espectrômetro interferométrico Bruker Avance III HD 300 equipado com acessório pneumático para análises de amostras sólidas e sonda de 4 mm multinuclear de dois canais (instalada), com canal multinuclear para observação de núcleos de ^{31}P. Os resultados dessa medida têm como objetivo mostrar como os átomos de fósforo estão ligados e como as ligações se modificam com a adição de estabilizantes no processo de liofilização.

3.2.5 Análise Estatística e Modelagem

Uma análise de variância de uma via (ANOVA) com comparações múltiplas de Tukey foi aplicada aos dados para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes experimentos. O delineamento experimental, a análise de dados, os gráficos de contorno, e a otimização simultânea das variáveis de resposta foram realizados utilizando o software Minitab® 19 (Minitab Inc., State College, PA, EUA). O nível de confiança utilizado foi de $\alpha = 0,05$. Todas as análises estatísticas consideraram medições analíticas em duplicata obtidas de duas amostras preparadas de forma independente (Lima *et al.*, 2024).

3.2.6 Modelagem de Regressão para Otimização

A análise de regressão para misturas foi aplicada aos dados com o objetivo de determinar os coeficientes estimados e a significância dos termos do modelo, além do teste F e do coeficiente de determinação R^2. Os resultados foram ajustados a diferentes modelos de regressão para misturas, em ordem crescente de complexidade: linear, quadrático, cúbico especial e quártico especial. A adequação dos modelos foi avaliada considerando a significância global, a falta de ajuste e o valor de R^2 ajustado, que expressa a proporção da variação nas respostas explicada pelo modelo, corrigida pelo número de termos. Quando necessário, os modelos foram reduzidos, preservando apenas os termos significativos (Hasan; Hussain, 2022). Os modelos testados para quatro componentes podem ser expressos de forma geral como:

- Linear:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 \quad \text{Equação 7}$$

- Quadrático:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \quad \text{Equação 8}$$

- Cúbico especial:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \beta_{124} X_1 X_2 X_4 + \beta_{134} X_1 X_3 X_4 + \beta_{234} X_2 X_3 X_4 \quad \text{Equação 9}$$

- Quártico especial:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \beta_{124} X_1 X_2 X_4 + \beta_{134} X_1 X_3 X_4 + \beta_{234} X_2 X_3 X_4 + \beta_{1234} X_1 X_2 X_3 X_4 \quad \text{Equação 10}$$

onde Ycorresponde à resposta predita; β_i representa os efeitos lineares dos componentes (citrato, monofosfato, difosfato e trifosfato de sódio); β_{ij} os efeitos de interação binária; β_{ijk} os efeitos de interação ternária; e β_{1234} a interação de quatro vias entre os sais. Após a obtenção das equações ajustadas, gráficos de contorno foram gerados para visualizar a influência das proporções dos sais quelantes sobre cada variável de resposta.

3.3 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados e discutidos os resultados obtidos para as análises físico-químicas realizadas nas amostras, visando avaliar o efeito das diferentes combinações de sais quelantes sobre a estabilidade coloidal do leite.

3.3.1 Planejamento de misturas

Considerando o leite controle, sem a adição de sais quelantes (SM), como referência, a Tabela 4 apresenta os valores médios das análises físico-químicas realizadas antes e após o tratamento térmico (TT), permitindo avaliar o efeito do processamento sobre as propriedades do leite.

Tabela 4 – Dados físico-químicos para leites controle sem adição de sais quelantes (SM), antes e depois do tratamento térmico (TT)

Análise	Antes TT	Depois TT
pH	6,70 ± 0,06	6,60 ± 0,06
Ca^{2+} (mmol L^{-1})	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Ca^{2+} em pH = 4 (mmol L^{-1})	17 ± 3	16 ± 3
Dv90 (μm)	0,221 ± 0,004	0,239 ± 0,007
HCT (min)	28 ± 5	11 ± 2

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A Tabela 5 reúne os resultados das análises físico-químicas obtidos para os 19 experimentos do planejamento de misturas antes do tratamento térmico, enquanto a Tabela 6 apresenta os resultados correspondentes após o tratamento térmico. Esses dados permitiram avaliar a influência das diferentes combinações de citrato de sódio, monofosfato, difosfato e trifosfato sobre as propriedades físico-químicas do leite.

Tabela 5 – Análises físico-químicas das amostras de leite com adição de sais quelantes

N° exp	pH	Ca^{2+} (mmol L^{-1})	Ca^{2+} pH=4 (mmol L^{-1})	Dv90 (μm)	HCT (min)
1	6,74 ± 0,02	0,55 ± 0,02	9,4 ± 0,1	0,2185 ± 0,002	11,08 ± 0,08
2	6,44 ± 0,02	1,15 ± 0,1	14 ± 2	0,218 ± 0,002	29 ± 1
3	6,33 ± 0,01	0,46 ± 0,02	16,0 ± 0,9	0,2260 ± 0,0001	3,0 ± 0,2
4	6,88 ± 0,01	0,22 ± 0,01	11,5 ± 0,7	0,220 ± 0,003	4,8 ± 0,4
5	6,54 ± 0,01	0,83 ± 0,00	22,2 ± 0,4	0,224 ± 0,003	12 ± 2
6	6,53 ± 0,01	0,44 ± 0,01	13,4 ± 0,4	0,230 ± 0,002	10,7 ± 0,8
7	6,81 ± 0,01	0,45 ± 0,04	15 ± 2	0,2230 ± 0,002	12 ± 3
8	6,58 ± 0,01	0,67 ± 0,07	13 ± 2	0,2230 ± 0,0001	11 ± 3
9	6,92 ± 0,04	0,47 ± 0,03	13,4 ± 0,3	0,215 ± 0,002	17 ± 3
10	6,58 ± 0,01	0,22 ± 0,01	10,0 ± 0,7	0,2225 ± 0,0007	3,47 ± 0,05
11	6,70 ± 0,01	0,68 ± 0,01	17,4 ± 0,4	0,227 ± 0,003	10 ± 3
12	6,65 ± 0,01	0,54 ± 0,00	15,0 ± 0,2	0,222 ± 0,003	12 ± 1
13	6,72 ± 0,01	0,67 ± 0,03	12 ± 1	0,217 ± 0,003	12 ± 2
14	6,57 ± 0,00	0,41 ± 0,01	9,1 ± 0,4	0,233 ± 0,003	3,0 ± 0,1

15	6,66 ± 0,04	0,53 ± 0,04	10,9 ± 0,4	0,223 ± 0,003	8 ± 1
16	6,59 ± 0,01	0,51 ± 0,02	12 ± 2	0,229 ± 0,003	8,1 ± 0,8
17	6,42 ± 0,01	0,65 ± 0,02	13 ± 2	0,2260 ± 0,0001	12,4 ± 0,9
18	6,47 ± 0,03	0,57 ± 0,03	12 ± 1	0,223 ± 0,006	6,28 ± 0,03
19	6,60 ± 0,01	0,54 ± 0,02	11 ± 1	0,223 ± 0,006	6,64 ± 0,03

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Tabela 6 – Análises físico-químicas das amostras de leite com adição de sais quelantes e tratamento térmico.

N° exp	pH	Ca^{2+} (mmol L^{-1})	Ca^{2+} pH=4 (mmol L^{-1})	Dv90 (µm)	HCT (min)
1	6,67 ± 0,01	0,48 ± 0,01	12 ± 2	0,245 ± 0,003	9,7 ± 0,5
2	6,37 ± 0,03	0,70 ± 0,02	14,1 ± 0,8	0,245 ± 0,003	24 ± 1
3	6,38 ± 0,04	0,52 ± 0,04	14 ± 1	0,2565 ± 0,0007	8 ± 1
4	6,58 ± 0,01	0,28 ± 0,01	7,3 ± 0,1	0,247 ± 0,008	7 ± 2
5	6,53 ± 0,03	0,66 ± 0,02	21,1 ± 0,7	0,244 ± 0,006	11,5 ± 0,6
6	6,50 ± 0,01	0,42 ± 0,01	15,0 ± 0,4	0,260 ± 0,008	11,3 ± 0,6
7	6,81 ± 0,05	0,28 ± 0,01	11,9 ± 0,9	0,247 ± 0,003	8,7 ± 0,3
8	6,57 ± 0,01	0,60 ± 0,07	14,8 ± 0,4	0,248 ± 0,002	7,7 ± 0,3
9	6,76 ± 0,01	0,39 ± 0,05	13,4 ± 0,9	0,249 ± 0,005	37,5 ± 0,1
10	6,50 ± 0,01	0,24 ± 0,01	11,7 ± 0,6	0,24 ± 0,01	4,9 ± 0,7
11	6,48 ± 0,04	0,50 ± 0,04	18 ± 1	0,240 ± 0,006	6,5 ± 0,4
12	6,66 ± 0,01	0,41 ± 0,03	15,7 ± 0,4	0,269 ± 0,003	7,7 ± 0,2
13	6,59 ± 0,01	0,50 ± 0,01	12,4 ± 0,4	0,25 ± 0,03	7 ± 1
14	6,51 ± 0,03	0,26 ± 0,02	10,1 ± 0,8	0,233 ± 0,001	1,9 ± 0,3
15	6,60 ± 0,02	0,40 ± 0,01	11,6 ± 0,8	0,25 ± 0,03	7 ± 1
16	6,56 ± 0,02	0,40 ± 0,01	12,4 ± 0,8	0,275 ± 0,003	7 ± 1
17	6,37 ± 0,01	0,47 ± 0,01	13,7 ± 0,3	0,257 ± 0,003	9 ± 2
18	6,40 ± 0,03	0,64 ± 0,06	12,8 ± 0,2	0,239 ± 0,007	5,9 ± 0,1
19	6,59 ± 0,02	0,47 ± 0,03	10,2 ± 0,6	0,279 ± 0,002	6,1 ± 0,2

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando apenas os dados obtidos após o tratamento térmico, uma vez que o objetivo principal deste estudo foi investigar a estabilidade coloidal do leite submetido ao aquecimento.

A metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* - RSM) foi empregada para avaliar a influência das diferentes combinações de sais quelantes sobre cada variável de resposta e identificar as regiões experimentais associadas aos melhores resultados. Para isso, os dados foram ajustados por modelos de regressão polinomial, cuja adequação foi avaliada por análise de variância (ANOVA). Para cada variável, foi selecionado o modelo que apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais.

A Tabela 7 apresenta os modelos selecionados, juntamente com os valores do teste F, coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância.

Tabela 7 – Ajuste do modelo para cada variável de resposta e os dados estatísticos obtidos ao aplicar a ANOVA dos modelos selecionados.

Variável resposta	Modelo	Teste-F	R^2	p-valor
pH	Quadrático	3,56	78,08%	0,036
Cálcio iônico	Linear	5,74	53,46%	0,008
Cálcio iônico em pH = 4	Cúbico	7,15	94,90%	0,020
Tamanho de partícula	Quártico	0,63	83,41%	0,766
HCT	Cúbico	9,50	96,11%	0,011

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise estatística indicou que os modelos ajustados para pH, cálcio iônico, cálcio iônico em pH = 4,0 e HCT apresentaram ajuste estatisticamente significativo ($p < 0,05$), indicando que as combinações de sais exerceram influência sobre essas variáveis. Os coeficientes de determinação (R^2) variaram entre 53,46% e 96,11%, indicando que os modelos explicaram grande parte da variabilidade observada. O modelo cúbico especial apresentou o melhor desempenho para as respostas de cálcio iônico em pH = 4,0 e HCT, explicando a maior parte da variabilidade experimental. Em contrapartida, nenhum dos modelos avaliados

descreveu adequadamente os resultados de tamanho de partícula, cujo modelo quártico especial apresentou ausência de significância estatística (p = 0,766).

Com o objetivo de facilitar a interpretação dos resultados do planejamento de misturas com quatro componentes, optou-se por representar os modelos por meio de gráficos ternários, nos quais cada gráfico corresponde a uma combinação de três dos quatro sais avaliados. A seguir, cada variável de resposta é discutida individualmente.

3.3.1.1 pH

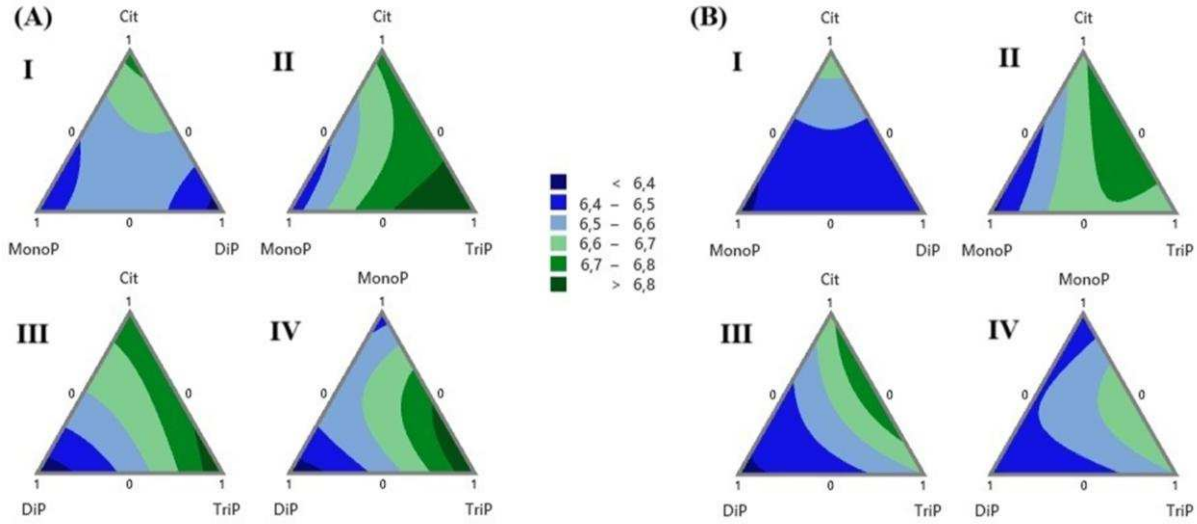
O pH médio do leite controle foi de 6,70 antes do tratamento térmico e de 6,60 após o aquecimento, indicando uma pequena redução provocada pelo processamento, tabela 4. A Figura 2 apresenta a distribuição dos valores de pH obtidos antes (Figura 2A) e após (Figura 2B) o tratamento térmico para as diferentes combinações de sais quelantes.

As misturas contendo maiores proporções de monofosfato e difosfato apresentaram os menores valores de pH, enquanto aquelas com maiores proporções de citrato de sódio e/ou trifosfato resultaram nos maiores valores. Esse comportamento foi observado tanto antes quanto após o tratamento térmico.

Entre as regiões avaliadas, as misturas representadas no diagrama ternário II (citrato, monofosfato e trifosfato) apresentaram valores de pH mais próximos aos do leite controle. Comportamento semelhante foi observado nas combinações entre citrato, difosfato e trifosfato (diagrama III) e entre os três fosfatos (diagrama IV). Como alterações acentuadas no pH podem modificar o equilíbrio mineral do leite e comprometer sua estabilidade coloidal, essas regiões foram consideradas as mais adequadas.

No diagrama II, a região correspondente a 33% a 100% de trifosfato, 0 a 12,5% de monofosfato e 0 a 25% ou 90 a 100% de citrato apresentou valores de pH mais próximos ao do leite controle, sendo considerada a região de maior interesse para essa variável.

Figura 3 – Gráficos de contorno para pH dos leites com adição de sais quelantes (A) leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Considerando misturas constituídas por um terço de cada componente, os diagramas ternários II (citrato, monofosfato e trifosfato), III (citrato, difosfato e trifosfato) e IV (monofosfato, difosfato e trifosfato) apresentaram valores de pH entre 6,5 e 6,6, próximos aos observados para o leite controle. Em contrapartida, o diagrama I (citrato, monofosfato e difosfato) apresentou os menores valores de pH, entre 6,4 e 6,5.

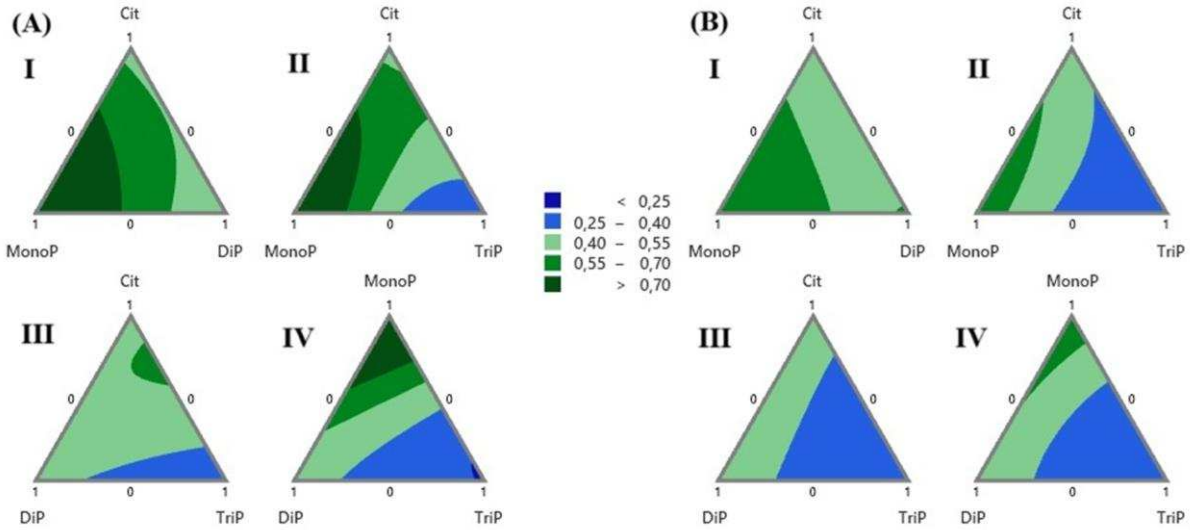
As diferenças observadas entre as misturas podem ser explicadas pelas características químicas dos sais utilizados. O citrato de sódio, derivado do ácido cítrico, pode promover alterações no pH devido às suas propriedades ácido-base e à capacidade de quelar íons Ca^{2+}, modificando o equilíbrio mineral do leite. Entre os fosfatos de sódio, o trifosfato de sódio ($Na_5P_3O_{10}$), constituído por três unidades de fosfato condensadas, apresenta caráter mais alcalino e tende a promover uma elevação mais pronunciada do pH (Tsioulpas *et al.*, 2010). Em contrapartida, o monofosfato de sódio (NaH_2PO_4), constituído por uma unidade de fosfato, e o difosfato de sódio ($Na_2H_2P_2O_7$), constituído por duas unidades de fosfato condensadas, apresentam comportamento ácido-base distinto e podem contribuir para a redução do pH do leite (Gao et al., 2011). Assim, o pH final do leite resulta da combinação entre as propriedades ácido-base desses sais, o grau de condensação das espécies fosfatadas, sua capacidade de quelar ou complexar íons Ca^{2+} e suas interações com o sistema tamponante do leite (Gao *et al.*, 2011).

3.3.1.2 Cálcio Iônico

O leite controle apresentou concentração média de cálcio iônico de 1,0 mmol L^{-1} antes do tratamento térmico e de 0,8 mmol L^{-1} após o aquecimento. A Figura 3 apresenta a distribuição dos valores de cálcio iônico obtidos antes (Figura 3A) e após (Figura 3B) o tratamento térmico para as diferentes combinações de sais quelantes.

Em todas as misturas avaliadas, a concentração de cálcio iônico foi inferior à observada para o leite controle, indicando que todos os sais apresentaram capacidade de quelar Ca^{2+}. Entre eles, o trifosfato de sódio foi o mais eficiente, promovendo as menores concentrações de cálcio livre tanto antes quanto após o tratamento térmico. As maiores concentrações de cálcio iônico foram observadas nas misturas contendo maiores proporções de monofosfato e citrato, representadas principalmente nos diagramas ternários I e III, além da região do diagrama IV com maior proporção de monofosfato. Em contrapartida, as menores concentrações ocorreram nas misturas contendo trifosfato de sódio, observadas nos diagramas II, III e IV. Nessas regiões, o aumento da proporção de trifosfato promoveu uma redução mais acentuada da concentração de cálcio livre, indicando maior eficiência desse sal no sequestro de Ca^{2+}. À medida que sua proporção diminuía, esse efeito tornava-se menos intenso.

Figura 4 – Gráficos de contorno para cálcio iônico em mmol L^{-1} dos leites com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Considerando misturas constituídas por um terço de cada componente, o diagrama ternário I (citrato, monofosfato e difosfato) apresentou concentrações de cálcio iônico entre 0,40 e 0,55 mmol L^{-1}. Já os diagramas ternários II (citrato, monofosfato e trifosfato), III (citrato, difosfato e trifosfato) e IV (monofosfato, difosfato e trifosfato) apresentaram as menores concentrações de cálcio livre, entre 0,25 e 0,40 mmol L^{-1}.

A redução da concentração de cálcio iônico pode ser explicada pela capacidade dos sais quelantes de formar complexos solúveis com Ca^{2+}, diminuindo sua concentração livre na fase aquosa do leite. Embora todos os sais avaliados apresentem essa capacidade, o efeito foi mais pronunciado para o trifosfato de sódio, resultado que está de acordo com o comportamento observado nos gráficos de contorno e com a literatura (Gao *et al.*, 2011).

Além da ação dos agentes quelantes, a diminuição da concentração de cálcio solúvel após o tratamento térmico também é esperada. Durante o aquecimento, parte do cálcio solúvel migra para a fase coloidal, favorecendo a precipitação do fosfato tricálcico devido à menor solubilidade desse composto em temperaturas elevadas (LEWIS, 2011).

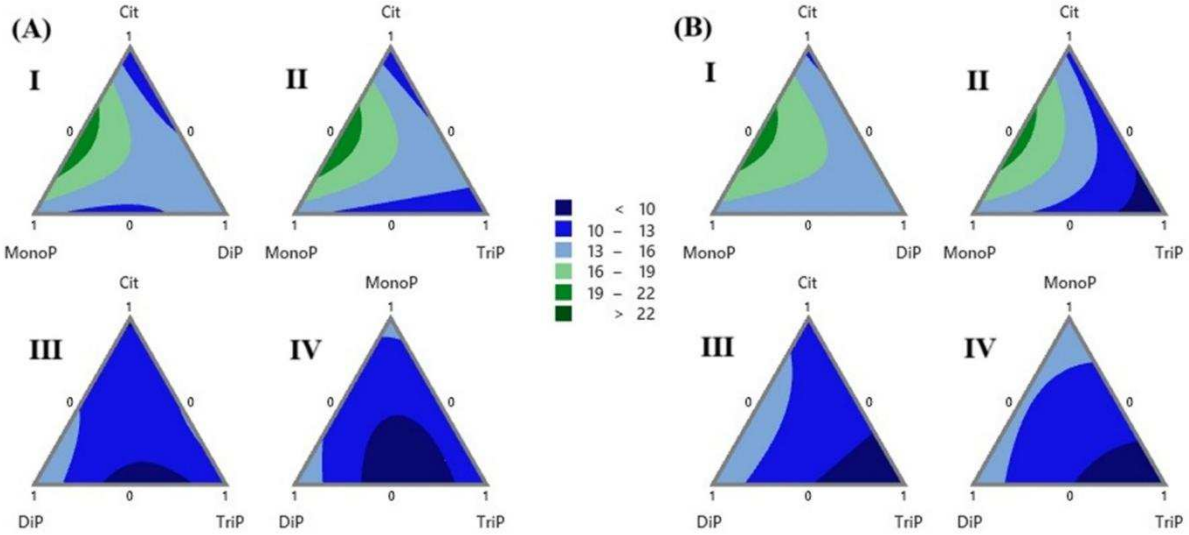
3.3.1.3 Cálcio Iônico em pH = 4

Com o objetivo de avaliar a influência dos sais quelantes sobre a distribuição do cálcio entre as fases solúvel e coloidal, as amostras foram acidificadas até pH = 4 antes da determinação do cálcio. Nessa condição, próxima ao ponto isoelétrico das caseínas, ocorre a solubilização do fosfato de cálcio coloidal, permitindo determinar o cálcio que anteriormente estava associado às micelas de caseína.

O leite controle apresentou concentração média de cálcio de 17 mmol L^{-1} antes do tratamento térmico e de 16 mmol L^{-1} após o aquecimento. A Figura 4 apresenta os gráficos de contorno obtidos para essa variável antes (Figura 4A) e após (Figura 4B) o tratamento térmico.

As tendências observadas antes e após o tratamento térmico foram semelhantes. Diferentemente do cálcio iônico, nessa análise foram observadas misturas que apresentaram concentrações tanto inferiores quanto superiores às do leite controle. Novamente, as misturas contendo trifosfato de sódio apresentaram as menores concentrações de cálcio, principalmente nos diagramas ternários II, III e IV, indicando maior capacidade desse sal em alterar o equilíbrio do cálcio no sistema. Em contrapartida, as misturas contendo maiores proporções de monofosfato e citrato apresentaram as maiores concentrações.

Figura 5 – Gráficos de contorno para cálcio iônico em pH = 4 em mmol L^{-1} dos leites com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

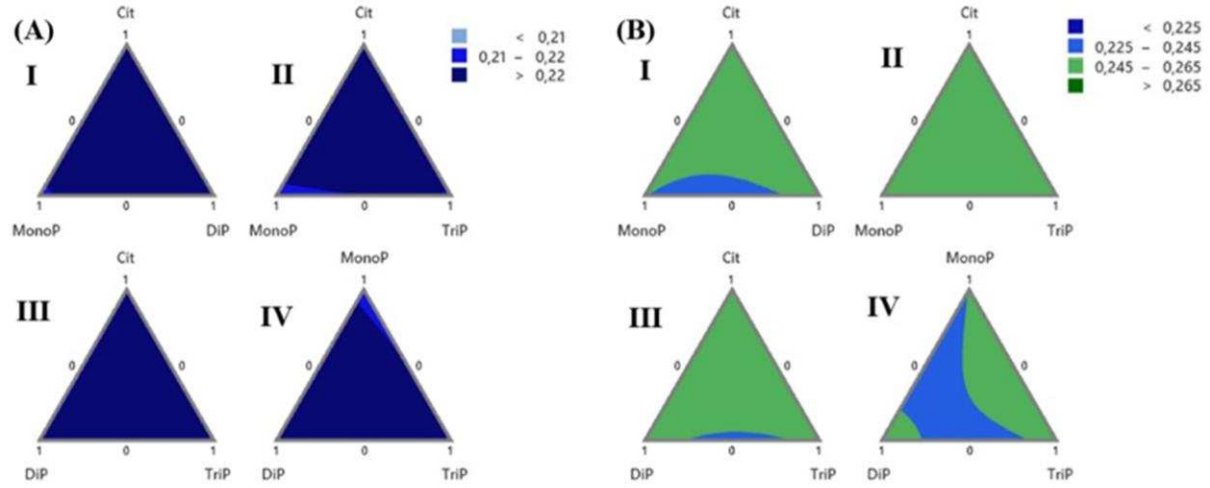
Considerando misturas constituídas por um terço de cada componente, o diagrama I (citrato, monofosfato e difosfato) apresentou concentrações entre 16 e 19 mmol L^{-1}. No diagrama II (citrato, monofosfato e trifosfato), os valores variaram entre 13 e 16 mmol L^{-1}, enquanto os diagramas III (citrato, difosfato e trifosfato) e IV (monofosfato, difosfato e trifosfato) apresentaram as menores concentrações, entre 10 e 13 mmol L^{-1}.

3.3.1.4 Distribuição no Tamanho de Partícula

O tamanho médio das partículas, expresso por Dv90, foi de 0,221 µm para o leite controle antes do tratamento térmico e de 0,239 µm após o aquecimento. A Figura 5 apresenta os gráficos de contorno obtidos antes (Figura 5A) e após (Figura 5B) o tratamento térmico para as diferentes combinações de sais quelantes.

Antes do tratamento térmico, a adição dos sais quelantes não promoveu alterações expressivas no tamanho das partículas. Após o aquecimento, observou-se um pequeno aumento dos valores de Dv90 em relação ao leite controle. Porém, as diferentes combinações de sais apresentaram comportamento semelhante, indicando que a variação na proporção dos quelantes exerceu pouca influência sobre essa resposta.

Figura 6 – Gráficos de contorno para tamanho de partícula dos leites em µm com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Considerando os diagramas ternários correspondentes às misturas constituídas por um terço de cada componente, os valores obtidos após o tratamento térmico variaram entre 0,245 e 0,265 µm. Esses resultados indicam que a distribuição do tamanho das partículas permaneceu praticamente constante, independentemente da combinação de sais utilizada.

O discreto aumento observado após o tratamento térmico pode ser atribuído às alterações estruturais promovidas pelo aquecimento, que modificam o equilíbrio salino do leite e favorecem a interação entre proteínas do soro desnaturadas e as micelas de caseína, resultando em um pequeno aumento do tamanho hidrodinâmico das partículas (Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022). Além disso, Tsioulpas *et al*. (2010) observaram que a esterilização promove aumento no tamanho das micelas de caseína, enquanto a adição de citrato e diferentes fosfatos exerce efeito limitado sobre esse parâmetro, comportamento semelhante ao observado neste estudo.

Esses resultados corroboram a análise estatística apresentada anteriormente, na qual o modelo ajustado para o tamanho de partícula não foi significativo ($p > 0,05$), indicando que, nas condições avaliadas, a variação na proporção dos sais quelantes não exerceu influência significativa sobre a distribuição do tamanho das partículas.

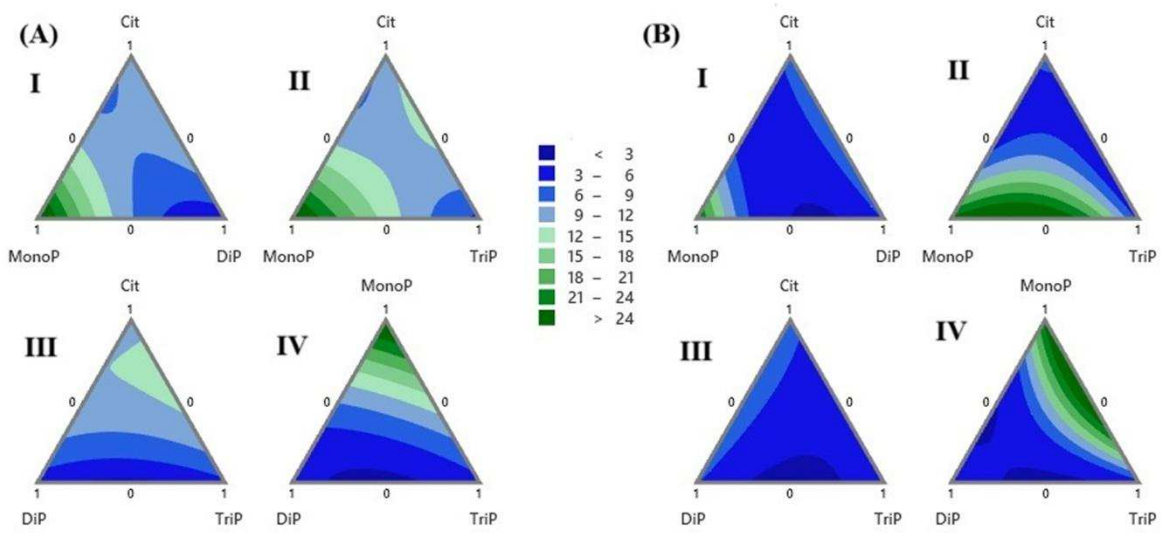
3.3.1.5 Heat coagulation time (HCT)

O tempo médio de coagulação térmica (HCT) do leite controle foi de 28 minutos antes do tratamento térmico e de 11 minutos após o aquecimento, tabela 4. A Figura 6 apresenta os gráficos de contorno obtidos antes (Figura 6A) e após (Figura 6B) o tratamento térmico para as diferentes combinações de sais quelantes.

Antes e após o tratamento térmico, foi observado comportamento semelhante entre as misturas avaliadas. De modo geral, o aumento da proporção de monofosfato promoveu maiores tempos de coagulação, indicando maior estabilidade térmica do leite. Em contrapartida, as misturas contendo maiores proporções de difosfato e trifosfato apresentaram menores tempos de coagulação.

Considerando apenas as amostras submetidas ao tratamento térmico, as maiores respostas de HCT (entre 21 e 24 minutos) foram obtidas nas misturas contendo monofosfato e trifosfato, representadas nos diagramas ternários II e IV. Já as menores respostas (entre 3 e 9 minutos) foram observadas nas misturas contendo citrato, difosfato e trifosfato, representadas principalmente no diagrama III.

Figura 7 – Gráficos de contorno para *heat coagulation time* (HCT) em minutos dos leites com adição de sais quelantes (A) e leites com adição de sais quelantes e tratamento térmico (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Considerando misturas constituídas por um terço de cada componente, os diagramas ternários I (citrato, monofosfato e difosfato) e III (citrato, difosfato e trifosfato) apresentaram tempos de coagulação entre 3 e 9 minutos. No diagrama II (citrato, monofosfato e trifosfato), os valores variaram entre 12 e 15 minutos, enquanto no diagrama IV (monofosfato, difosfato e trifosfato) os tempos ficaram entre 9 e 12 minutos. Entre as misturas ternárias avaliadas, o diagrama II apresentou os maiores tempos de coagulação e, consequentemente, a maior estabilidade térmica.

A estabilidade térmica do leite está diretamente relacionada ao equilíbrio mineral do sistema. A distribuição do cálcio entre as fases solúvel e coloidal é um dos principais fatores responsáveis por esse equilíbrio. Durante o aquecimento, ocorrem alterações na estrutura das micelas de caseína, acompanhadas da desnaturação das proteínas do soro, que passam a interagir com a superfície micelar. Essas modificações favorecem a agregação das proteínas e, consequentemente, a coagulação do leite (Ahmadi; Huppertz; Vasiljevic, 2024; Horne, 2010; Nieuwenhuijse; Huppertz, 2022; Wu; Chen; Van der Meeren, 2024).

Os resultados obtidos indicam que a presença de monofosfato contribuiu para aumentar o tempo de coagulação térmica, enquanto as misturas contendo maiores proporções de trifosfato apresentaram menor HCT, mesmo apresentando as menores concentrações de cálcio iônico. Esses resultados mostram que a estabilidade térmica do leite não depende exclusivamente da concentração de cálcio livre, mas do equilíbrio entre o pH, a distribuição mineral e as interações entre as proteínas durante o aquecimento (Wang & Ma, 2020).

3.3.2 Otimização de múltiplos parâmetros

Antes da etapa de otimização, foi realizada uma análise de correlação de Pearson entre os parâmetros físico-químicos obtidos após o tratamento térmico. Como o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade térmica do leite, a análise foi realizada apenas com os resultados obtidos após o tratamento térmico. A partir dessa etapa, foi possível identificar quais variáveis estavam relacionadas entre si e definir quais seriam utilizadas na otimização. Os coeficientes de correlação estatisticamente significativos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Análise de correlação de Pearson entre as variáveis testadas que foram significativas, para o leite com adição de sais e tratamento térmico

Variável 1	Variável 2	Correlação (r)	p-valor

Ca^{2+}	pH	-0,457	0,049
Ca^{2+} em pH=4	Ca^{2+}	0,588	0,008

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise mostrou uma correlação negativa moderada entre a concentração de cálcio iônico e o pH (r = -0,457; p = 0,049), indicando que amostras com maiores concentrações de cálcio iônico tenderam a apresentar menores valores de pH. Também foi observada uma correlação positiva moderada entre o cálcio determinado em pH = 4 e o cálcio iônico (r = 0,588; p = 0,008), indicando que amostras com maiores concentrações de cálcio iônico também apresentaram maiores concentrações de cálcio após a acidificação.

Como o cálcio determinado em pH = 4 apresentou correlação com o cálcio iônico, optou-se por utilizar apenas o pH e o cálcio iônico na etapa de otimização. Dessa forma, foi possível reduzir o número de variáveis avaliadas sem perder informações importantes sobre o comportamento do sistema.

Com base nesses resultados, foram definidos os critérios utilizados na otimização. O objetivo foi obter valores de pH e cálcio iônico próximos aos estabelecidos como desejáveis para o leite após o tratamento térmico, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores previstos e experimentais para parâmetros de otimização da mistura de sais quelantes

Variável de resposta independente	Objetivo	Inferior	Alvo	Superior
pH	Alvo	6,37	6,6	6,81
Ca^{2+}	Alvo	0,24	0,7	0,8

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A composição obtida pela otimização foi de 46,46% de citrato de sódio, 37,57% de monofosfato de sódio e 15,97% de trifosfato de sódio. Essa composição foi calculada a partir dos critérios definidos para pH e cálcio iônico e, posteriormente, utilizada na etapa de validação experimental. Para verificar a capacidade preditiva da otimização, a mistura foi preparada experimentalmente e os valores obtidos foram comparados com aqueles previstos, permitindo verificar se os resultados experimentais estavam de acordo com os valores calculados.

3.3.3 Verificação de Modelos Preditivos

Após a definição da composição otimizada pelo modelo de mistura, descrita no tópico anterior, a combinação de sais foi preparada experimentalmente para a etapa de validação. O modelo previu valores de pH de 6,60 e concentração de cálcio iônico de 0,50 mmol L^{-1}, com desejabilidades individuais de 0,999 e 0,573, respectivamente, resultando em uma desejabilidade composta de 0,756, Esse índice utilizado na etapa de otimização para indica o quanto uma determinada condição atende aos critérios definidos para cada variável de resposta.

Os valores obtidos experimentalmente foram de pH 6,58 e concentração de cálcio iônico de 0,46 mmol L^{-1}, ambos muito próximos aos previstos pelo modelo. O erro relativo entre os valores previstos e experimentais foi inferior a 5%, mostrando que os resultados obtidos ficaram muito próximos daqueles previstos pela otimização. Esses resultados mostram que o modelo foi capaz de representar o comportamento das variáveis avaliadas para a composição proposta.

Durante a validação também foi observado que a adição dos sais seguida do tratamento térmico não provocou alteração na coloração do leite, diferente do observado em algumas das formulações avaliadas durante o planejamento experimental.

Neste estudo, a desejabilidade obtida para o cálcio iônico foi inferior à observada para o pH, indicando que essa variável ficou mais distante do valor estabelecido como alvo na otimização. Ainda assim, a desejabilidade composta de 0,756 mostra que a composição proposta atendeu de forma satisfatória aos critérios definidos para ambas as variáveis. Dessa forma, o modelo apresentou desempenho satisfatório para prever o comportamento do sistema nas condições avaliadas.

Os resultados obtidos mostram que a variação nas proporções de citrato de sódio, monofosfato, difosfato e trifosfato modifica a distribuição mineral do leite desnatado e influencia seu comportamento durante o tratamento térmico. As diferenças observadas para pH, cálcio iônico e tempo de coagulação não dependeram apenas da presença de cada sal individualmente, mas também das proporções em que esses sais foram combinados. A composição otimizada, formada por 46,46% de citrato de sódio, 37,57% de monofosfato de sódio e 15,97% de trifosfato de sódio, apresentou resultados experimentais próximos aos valores previstos, demostrando que o modelo foi capaz de prever adequadamente os resultados obtidos.

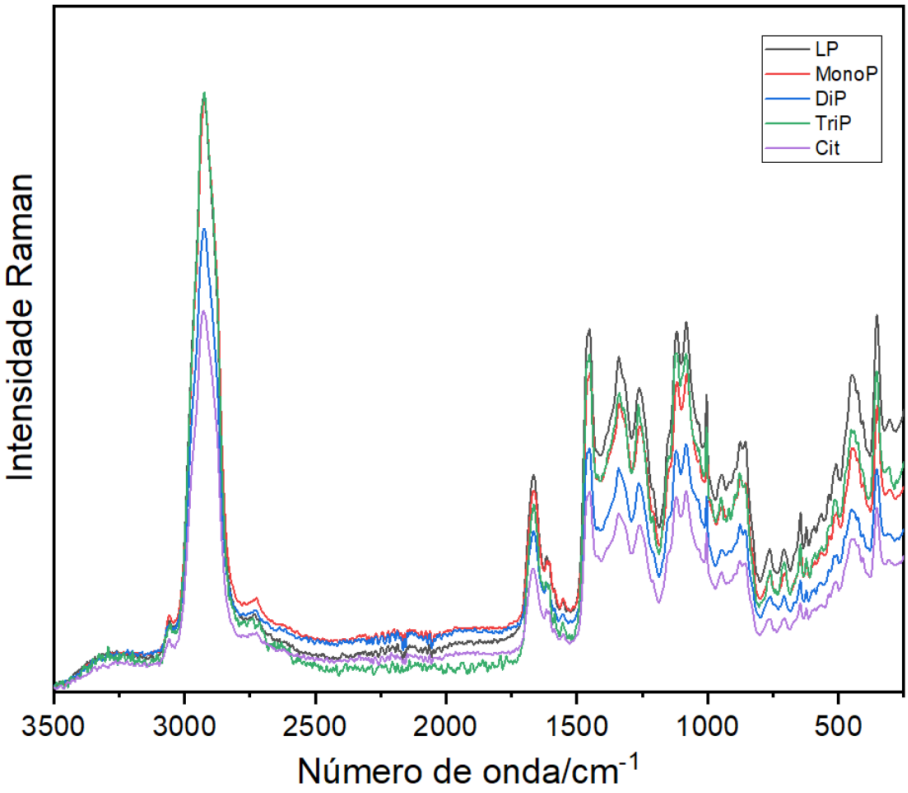
Embora este estudo tenha sido realizado em condições laboratoriais controladas e não represente condições de processamento industrial, os resultados mostram que o ajuste das proporções dos sais quelantes pode ser utilizado para modificar a distribuição mineral do leite

e sua estabilidade durante o tratamento térmico. Essas informações contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na estabilidade coloidal do leite e podem auxiliar no desenvolvimento de formulações destinadas ao processamento térmico em escala industrial.

3.3.4 Liofilização de leite contendo sais quelantes

Assim como nos tópicos anteriores, nesta seção são discutidos os resultados obtidos para o leite liofilizado. Conforme descrito na Seção 3.2.4, foram produzidas amostras de leite em pó com adição de sais quelantes, as quais foram caracterizadas por espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear de estado sólido (RMNES), além de serem avaliadas por análise de componentes principais (PCA). A Figura 7 apresenta os espectros Raman do leite em pó sem adição de sais (LP) e das amostras suplementadas com monofosfato, difosfato, trifosfato e citrato de sódio (MonoP, DiP, TriP e Cit, respectivamente).

Figura 8 – Espectros Raman para o leite em pó sem e com adição de sais quelantes, com laser em 1064 nm



LP leite em pó puro, MonoP leite em pó + monofosfato de sódio, DiP leite em pó + difosfato de sódio, TriP leite em pó + trifosfato de sódio.

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na tabela 10 tabela temos a tentativa de atribuição das bandas do leite em pó (Almeida *et al*., 2011).

Tabela 10 – Tentativa de atribuição das bandas Raman para o leite em pó, com laser em 1064 nm

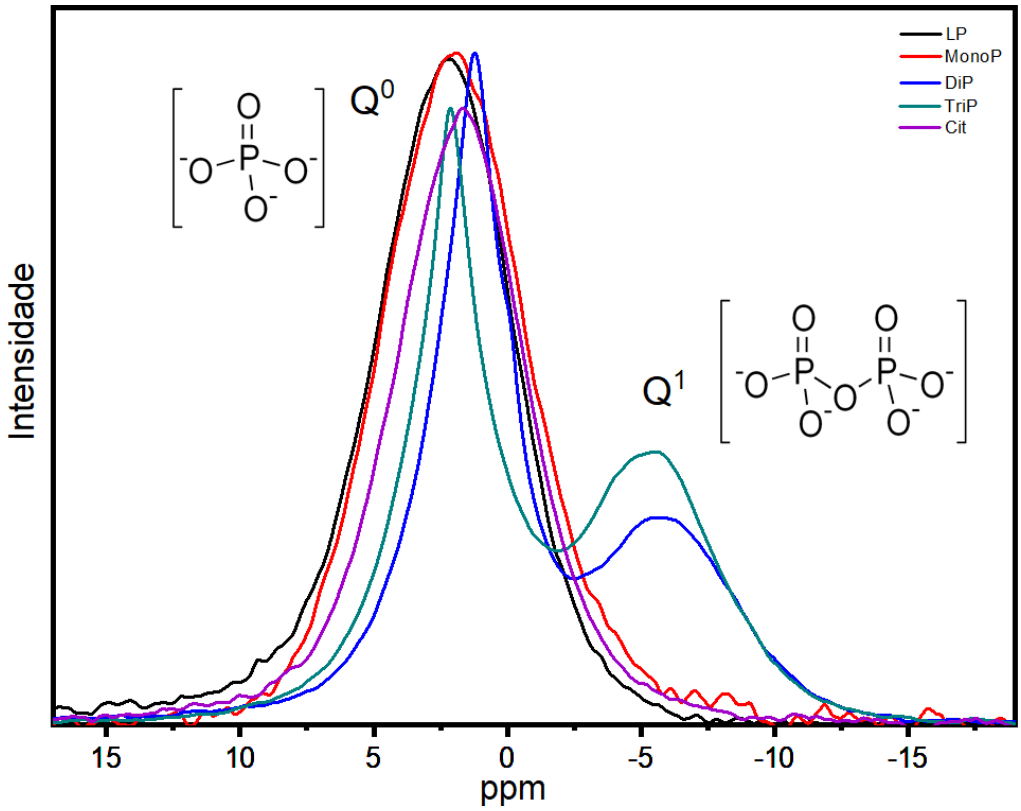
Número de onda / cm^{-1}	Atribuição
3283	ν(O-H) da água
3061	ν(=C−H) aromático ou olefínico de Proteínas (aminoácidos) / Lipídios insaturados
2924	grupos CH_2 e CH_3 de Lipídios e Proteínas
1666	Amida I (ν(C = O) peptídico) e ν(C = C)
1586	ν(C=C)
1455	δ(CH_2) de proteínas e gorduras
1340	δ(C-H) de Proteínas / Carboidratos
1118	ν(C-O) + ν (C-C) + δ(C-O-H) de lactose
1080	ν(C-O) + ν(C-C) + δ(C-O-H) de lactose
1004	Respiração anel (fenilalanina)
946	ν(C-O-C) + ν (C-O) + δ (C-O-H) de lactose

ν estiramento; δ deformação;

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Para uma análise complementar foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear do estado sólido (RMNES) do núcleo de ^{31}P, os espectros encontram-se na Figura 8.

Figura 9 – Espectros RMNES ^{31}P para o leite em pó e para os leites com adição de mono-, di-, trifosfato e citrato de sódio, liofilizados

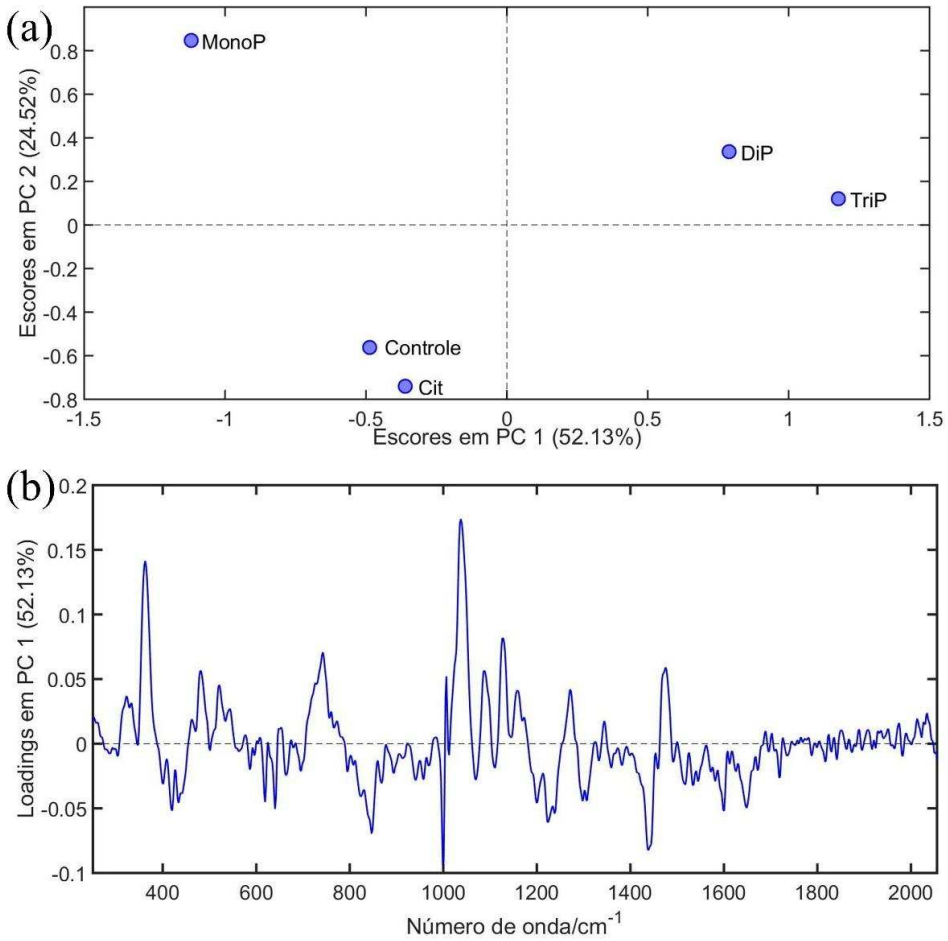


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Podemos observar que no leite em pó sem adição de sais, há a presença apenas de uma banda em 2,7 ppm, que é referente ao fósforo de monofosfato, ou seja, espécies Q^0, que correspondem a fósforos terminais, a mesma banda aparece para os espectros de leite em pó com adição de monofosfato de sódio, 2,4 ppm, e citrato, 2,02 ppm, que aparecem levemente deslocadas e com larguras pouco diferenciadas. Para as amostras de leite em pó com adição de difosfato e trifosfato de sódio, notamos que há duas bandas, para difosfato 1,61 e -5,31 ppm, que possui espécies Q^0 e Q^1 e para trifosfato, 2,54 e -4,99 ppm, que possui as mesmas espécies de fosfato (Casas *et al.*, 2010).

Para separação das amostras de leite em pó foi feita uma análise de componentes principais (PCA) dos espectros Raman, Figura 9. Com a PCA foi possível a separação do leite em pó e dos leites em pó com adição dos sais quelantes. No primeiro quadrante, se encontra o leite em pó com adição de monofosfato, no segundo quadrante leites em pó com adição de di- e trifosfatos próximos e o leite em pó e leite em pó com adição de citrato no quarto quadrante, indicando que houve uma separação das amostras.

Figura 10 – (a) *Scores* da PCA dos espectros do leite em pó, e do leite em pó com adição de mono-, di-, trifosfato e citrato de sódio, (b) *loadings*



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise por espectroscopia Raman combinada com a PCA mostrou diferenças entre o leite em pó sem e com sais quelantes. A distribuição dos escores das amostras em relação aos dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), que explicam juntos 76,65% da variabilidade total dos dados (52,13% para o PC1 e 24,52 % para o PC2), onde a parte positiva da PC1, é composta principalmente por di- e trifosfato. Pelo gráfico de pesos em PC1 vs. número de onda os fosfatos são semelhantes, a grande diferenciação acontece por parte citrato e do leite em pó sem adição de sais. Então, é possível notar que a região entre 1000 e 1100 cm^{-1} apresenta maior contribuição para o comportamento das amostras, essa região é característica. de vibrações de estiramento C-C e C-O de cadeias alifáticas, tal como de ligações P-O, o que poderia indicar que os sais adicionados ao leite interagiram com a matriz (Almeida *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2022).

Além disso, os espectros de RMNES corroboram com essa ideia, uma vez que podemos notar diferenças entre esses espectros do leite em pó sem adição de sais e os leites com adição de sais quelantes. A partir desses resultados podemos inferir que a adição dos sais quelantes utilizados neste estudo influenciaram a estabilidade do sistema coloidal do leite assim como suas propriedades físico-químicas.

3.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Este estudo demonstrou a importância do sinergismo entre diferentes sais quelantes, citrato e fosfatos de sódio na estabilidade coloidal do leite. Os resultados indicaram que a combinação desses sais apresenta melhor desempenho em comparação ao uso isolado de cada componente, especialmente no controle do pH e na disponibilidade de cálcio iônico, variáveis críticas para a estabilidade térmica do sistema. A formulação considerada ótima, determinada por meio da função de desejabilidade, correspondeu a 46,46% de citrato de sódio, 37,57% de monofosfato de sódio e 15,97% de trifosfato de sódio. Essa combinação foi validada experimentalmente, confirmando a capacidade preditiva do modelo matemático e garantindo resultados consistentes com as respostas previstas. O uso combinado de sais quelantes pode ser usado como estratégia para aumentar a estabilidade coloidal do leite submetido a tratamentos térmicos, como o processamento UHT.

A incorporação de agentes quelantes ao leite altera suas características físicas, químicas e sua resistência ao calor. Os resultados de leites com propriedades específicas, como maior estabilidade térmica e menor concentração de cálcio livre, são determinados pelo tipo e pela concentração do sal utilizado. Os dados obtidos na pesquisa podem ser aplicados na área industrial, atualização, procedimentos e fabricação de itens com características específicas desejadas.

4 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO VIBRACIONAL DA GORDURA DO LEITE DE DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS PELO MÉTODO DE FOLCH

Neste capítulo será discutida a aplicação das espectroscopias Raman e no infravermelho, associadas à quimiometria, para avaliar as diferenças entre as gorduras do leite de vaca, cabra, ovelha e búfala obtidas pelo método de Folch.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A gordura do leite constitui uma das frações mais complexas desse alimento e exerce influência direta sobre suas propriedades nutricionais, físico-químicas e sensoriais. Essa fração é composta principalmente por triacilgliceróis (TAG), que representam cerca de 98% dos lipídios totais, além de menores quantidades de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, esfingolipídios, esteróis e vitaminas lipossolúveis. Embora presentes em menor proporção, esses componentes desempenham funções importantes na estabilidade da emulsão, na organização dos glóbulos de gordura e nas características tecnológicas dos produtos lácteos (Gallier *et al.*, 2011; Mendes *et al.*, 2016).

Entre esses constituintes, os fosfolipídios merecem destaque por integrarem a membrana do glóbulo de gordura do leite (*Milk Fat Globule Membrane* - MFGM). Essa membrana é formada principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina e esfingomielina, cujas proporções variam entre diferentes espécies animais. Essas diferenças vêm de particularidades fisiológicas e nutricionais que influenciam a composição da gordura do leite, tornando sua caracterização importante tanto para estudos de qualidade quanto para investigações relacionadas à autenticidade e ao valor nutricional dos produtos lácteos (Gallier *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2023).

Além da composição da membrana lipídica, os ácidos graxos livres e os demais lipídios minoritários também contribuem para as propriedades sensoriais e funcionais do leite. Os ácidos graxos livres, originados da hidrólise dos triacilgliceróis, estão associados principalmente ao desenvolvimento de sabor e aroma, enquanto vitaminas lipossolúveis e esteróis agregam valor nutricional ao alimento. Em conjunto, esses compostos formam uma matriz altamente heterogênea, cuja composição pode variar de acordo com a espécie animal, alimentação, estágio de lactação e processamento do leite (Amores; Virto, 2019; Jukkola *et al.*, 2019).

As diferentes espécies animais apresentam perfis distintos de ácidos graxos, triacilgliceróis e fosfolipídios, o que influencia propriedades como textura, digestibilidade e estabilidade da gordura, além de fornecer marcadores importantes para a diferenciação e autenticação de produtos lácteos. Estudos utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas demonstram que a composição lipídica varia entre as espécies, tanto em relação aos ácidos graxos quanto às classes de fosfolipídios presentes na MFGM. Em todas as espécies, os ácidos palmítico (C16:0), mirístico (C14:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) figuram entre os principais constituintes da fração lipídica, embora suas proporções variem conforme a espécie animal (Ali *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Além das diferenças na composição de ácidos graxos, estudos também evidenciaram variações na composição da MFGM, principalmente nas classes de fosfolipídios fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI) e esfingomielina (SM). Essas diferenças refletem características próprias de cada espécie e influenciam a organização estrutural da membrana dos glóbulos de gordura, bem como suas propriedades físico-químicas (Wang *et al.*, 2023; Wei *et al.*, 2022).

A caracterização dessas diferenças tem sido realizada principalmente por cromatografia e espectrometria de massas. Wang *et al.* (2023), por exemplo, identificaram 74 espécies moleculares de fosfolipídios distribuídas em diferentes classes lipídicas, demonstrando que a composição molecular varia entre as espécies avaliadas. Da mesma forma, Wei *et al.* (2022) observaram diferenças na composição dos fosfolipídios e na estrutura dos glóbulos de gordura entre diferentes espécies de mamíferos. Esses resultados indicam que a gordura do leite apresenta assinaturas moleculares características, que podem servir como base para sua diferenciação e autenticação.

Para investigar essa fração, o método de extração desenvolvido por Folch permanece como uma das técnicas mais empregadas para o isolamento de lipídios. O protocolo utiliza uma mistura de clorofórmio e metanol capaz de recuperar, com elevada eficiência, tanto lipídios neutros quanto polares. Embora outros métodos, como Bligh e Dyer, Hara e Radin e Matyash, utilizem menores volumes de solventes ou apresentem menor toxicidade, o método de Folch continua sendo amplamente adotado quando se busca elevada recuperação de diferentes classes lipídicas e boa reprodutibilidade analítica, características importantes em estudos de caracterização química e espectroscópica (Folch; Lees; Sloane Stanley, 1957; Liu; Moate; Rochfort, 2019; Teixeira *et al.*, 2021).

Após a extração, a fração lipídica pode ser caracterizada por espectroscopia Raman e no infravermelho, técnicas rápidas e não destrutivas que fornecem informações sobre a estrutura molecular dos lipídios. Entre as bandas de maior interesse está a observada em aproximadamente 1750 cm^{-1}, atribuída ao estiramento da ligação C=O dos ésteres presentes nos triacilgliceróis, utilizada como um dos principais indicadores da presença de lipídios. Além da identificação de grupos funcionais, variações na posição e na intensidade das bandas podem refletir diferenças na composição de ácidos graxos e na organização da gordura, permitindo comparar amostras provenientes de diferentes espécies animais (Bandyopadhyay; Verma; Saha, 2025).

A interpretação desses espectros é auxiliada por ferramentas quimiométricas. Entre elas, a PCA é uma das técnicas mais utilizadas para reduzir a dimensionalidade de grandes conjuntos de dados e evidenciar padrões de similaridade entre amostras. A PCA transforma as variáveis originais em novos componentes ortogonais que concentram a maior parte da variabilidade do conjunto de dados, permitindo visualizar agrupamentos e identificar as variáveis responsáveis pelas diferenças observadas sem necessidade de conhecimento prévio das classes analisadas (Brereton, 2007; Jolliffe; Cadima, 2016)

A PCA integra um conjunto mais amplo de ferramentas da quimiometria, área dedicada ao emprego de métodos matemáticos e estatísticos para extrair informações relevantes de dados químicos. Além dos métodos exploratórios, a quimiometria engloba técnicas supervisionadas, como a Modelagem Independente por Analogia de Classes (*Soft Independent Modelling of Class Analogies* - SIMCA) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Leasr Squares Discrimant Analysis* - PLS-DA), amplamente utilizadas na classificação, autenticação e detecção de adulterações em alimentos (Brereton, 2007; Rohman; Windarsih, 2020).

A associação entre espectroscopia vibracional e quimiometria tem ampliado as possibilidades de caracterização, diferenciação e autenticação de produtos lácteos, permitindo extrair informações químicas relevantes a partir de grandes conjuntos de dados espectrais (Acharya; Nair; Abdul Salam, 2026; Rohman; Windarsih, 2020). Nos últimos anos, diversos estudos demonstraram o potencial da espectroscopia vibracional para diferenciar leites provenientes de diferentes espécies animais e identificar adulterações Wang *et al.* (2023) empregaram espectroscopia Raman associada à PCA para distinguir leite de vaca, cabra e amostras adulteradas, enquanto Yazgan *et al.* (2020) utilizaram Raman e PLS-DA para discriminar leites de vaca, cabra e ovelha. Estudos mais recentes, métodos de aprendizado de máquina têm sido incorporados às análises espectroscópicas, aumentando a acurácia na

classificação de amostras e na detecção de fraudes em produtos lácteos (Agiomavriti *et al.*, 2024; Feng *et al.*, 2024; Tarapoulouzi; Papademas, 2024; Zhao *et al.*, 2023).

Embora a espectroscopia vibracional venha sendo cada vez mais utilizada na avaliação de produtos lácteos, a maior parte dos estudos analisa o leite sem o isolamento da fração lipídica (Acharya; Nair; Abdul Salam, 2026; Wang *et al.*, 2023; Yazgan *et al.*, 2020). Trabalhos voltados especificamente para a caracterização espectroscópica da gordura extraída ainda são pouco frequentes, especialmente quando envolvem a comparação entre diferentes espécies animais. Como a composição lipídica varia entre essas espécies (Ali *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2023; Wei *et al.*, 2022), a análise da fração isolada pode evidenciar diferenças que nem sempre são observadas na matriz original do leite, contribuindo para estudos de autenticação e controle de qualidade.

Neste trabalho, a fração lipídica de leites de vaca, cabra, ovelha e búfala foi obtida pelo método de Folch e analisada por espectroscopia Raman e no infravermelho. A PCA foi utilizada para investigar diferenças entre os perfis espectrais das amostras, avaliando o potencial dessas técnicas na caracterização da gordura do leite de diferentes espécies animais.

4.2 METODOLOGIA

A metodologia utilizada na seção quatro encontra-se detalhada a seguir. Dentre a seção tem-se a coleta de amostras e análise físico-química e espectroscópica.

4.2.1 Coleta de amostras

Um total de 14 amostras de leite (n = 14) de quatro espécies animais (vaca, cabra, ovelha e búfala) foram incluídas neste estudo. As amostras apresentadas na Tabela 11 são independentes entre si (n = 1) e todas as análises foram realizadas em duplicata (duas repetições analíticas por amostra) tanto para a espectroscopia FTIR quanto para a Raman.

4.2.1.1 Amostras de Leite Cru

As amostras de leite cru foram obtidas individualmente de diferentes pequenos produtores de laticínios. Estas incluíram leite cru de vaca e de cabra coletado em duas localidades rurais em Juiz de Fora, Minas Gerais (Embrapa Gado de Leite e o distrito de

Linhares), e leite cru de cabra, ovelha e búfala coletado em fazendas localizadas em Paraíba do Sul, Rio de Janeiro. As amostras cruas foram fornecidas por produtores locais conhecidos ou coletadas diretamente pela autora nas fazendas da região.

4.2.2 Amostras de Leite Processado

Amostras comerciais de leite de vaca e de cabra (pasteurizado e UHT) foram adquiridas em mercados locais em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Estes produtos foram incluídos para avaliar o efeito do processamento térmico industrial na fração lipídica obtida pelo método de Folch.

Todas as amostras foram transportadas sob refrigeração imediatamente após a coleta ou compra e armazenadas a -5 ºC até a análise. As medições foram realizadas dentro de uma semana para preservar a integridade lipídica, e são mostradas na tabela 11.

Tabela 11 – Amostras de leite de diferentes espécies e tipos de processamento

Espécie	Local de coleta	Tipo de leite	Código
Vaca	Embrapa, Juiz de Fora - MG	Cru	VE
Vaca	Linhares, Juiz de Fora - MG	Cru	VL
Vaca	Comercial, Guarará - MG	Pasteurizado	VP
Vaca	Comercial, Jaborandi - BA	UHT	VT1
Vaca	Comercial, Sete Lagoas - MG	UHT	VT2
Vaca	Comercial, Três Rios - RJ	UHT	VT3
Cabra	Embrapa, Juiz de Fora - MG	Cru	CE
Cabra	Linhares, Juiz de Fora - MG	Cru	CL
Cabra	Paraíba do Sul - RJ	Cru	CFSA
Cabra	Comercial, Juiz de Fora - MG	Pasteurizado	CP
Cabra	Comercial, Serro - MG	UHT	CT1
Cabra	Comercial, Taquara - RS	UHT	CT2
Ovelha	Paraíba do Sul - RJ	Cru	OV
Búfala	Paraíba do Sul - RJ	Cru	BU

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

4.2.3 Análises físico-químicas

As amostras de leite foram submetidas a análises físico-químicas para avaliar parâmetros relacionados à estabilidade do sistema e às características de composição. Foram determinados o pH, o teor de cálcio iônico e o teor de gordura, conforme descrito nos itens a seguir.

4.2.3.1 pH

Para determinar a acidez das amostras, o pH foi medido à temperatura ambiente. Foi utilizado um medidor de pH digital, modelo PG1400 (fabricante Gehaka, São Paulo), previamente calibrado com soluções de referência em pH 4,0 e 7,0.

4.2.3.2 Determinação dos teores de cálcio

De acordo com Singh *et al.* (2019), para análise de teores de cálcio iônico foram utilizados o medidor de íons cálcio LAQUAtwin (Horiba Instruments). O medidor de íons cálcio foi calibrado usando soluções padrões de cálcio de 3,74 mmol L^{-1} (150 ppm) e 49,90 mmol L^{-1} (2000 ppm) antes de cada experimento. Para a determinação do cálcio iônico, uma pequena alíquota da amostra foi adicionada diretamente no sensor do equipamento para leitura.

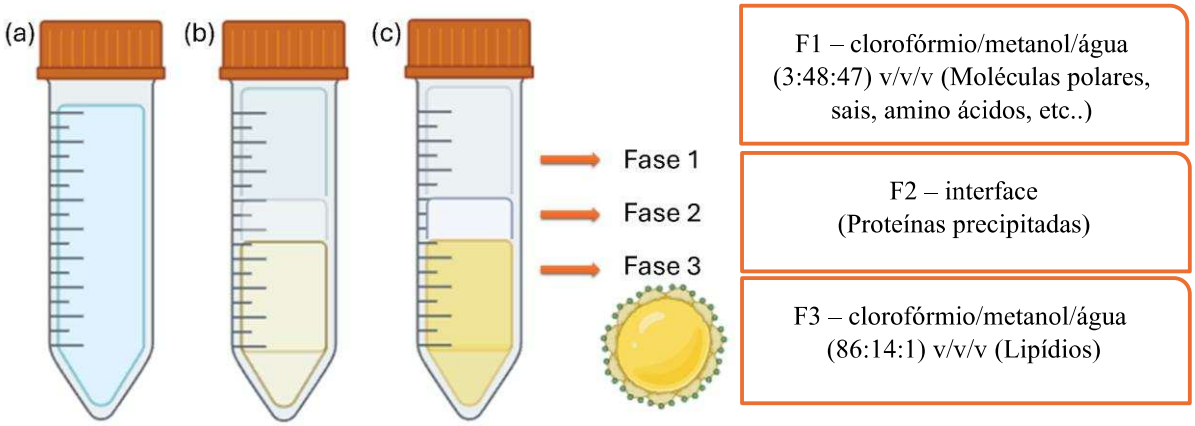
4.2.3.3 Determinação do teor de gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber. Para a análise, foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e 11 mL de amostra de leite a um butirômetro, seguidos da adição de 1 mL de álcool isoamílico. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada para promover a separação da gordura. Em seguida, os butirômetros foram mantidos em banho-maria, de modo a manter a gordura no estado líquido e permitir a leitura direta do teor de gordura na escala graduada do equipamento (Brasil, 2006; Pereira e Silva, 2001).

4.2.4 Extração lipídica

Os lipídios de diferentes tipos de leite animal foram extraídos de acordo com o método descrito por Folch *et al.* (1957), com as adaptações sugeridas por Wang *et al.* (2023), cujo trabalho serviu como base para as nossas comparações entre as técnicas analíticas e vibracionais. Desta forma, 6 mL de leite foram misturados com 24 mL de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) e homogeneizados em agitador do tipo Vortex por 5 minutos na velocidade máxima (≈2000 rpm), figura 10A. As misturas foram mantidas em banho de gelo (0-4 °C) por 30 minutos para evitar a separação da gordura, Figura 10B e, em seguida, centrifugadas a 5000 *g* por 15 minutos a 4 °C para isolar a fase orgânica inferior Figura 10C. A fase orgânica obtida foi evaporada até a secura em evaporador rotativo sob pressão reduzida (<30 °C) e reconstituída com 5 mL de éter de petróleo. A solução foi mantida em repouso por 10 minutos e, subsequentemente, centrifugada a 4000 *g* por 5 minutos para a remoção de quaisquer resíduos insolúveis. O sobrenadante resultante, contendo os lipídios extraídos, foi armazenado a -10 °C até o momento da análise (Stefanov; Vlaeminck; Fievez, 2010; Wang *et al.*, 2023).

Figura 11– representação da extração lipídica (método de Folch) e separação de fases: etapa de mistura da amostra e solventes (a), banho de gelo durante a separação de fases (b), centrifugação e recuperação da fase orgânica (fase 3) (c)



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

A Fase 1 corresponde à fração polar, composta principalmente por metanol e compostos hidrofílicos. A Fase 2 representa a camada interfacial sólida, associada às proteínas precipitadas. A Fase 3 é a fase orgânica, que contém a fração lipídica submetida à evaporação do solvente. Após esse processo, restam apenas as gorduras extraídas.

É importante destacar que o objetivo principal deste trabalho foi comparar os perfis lipídicos entre diferentes espécies animais. Os leites comerciais pasteurizados e UHT foram incluídos apenas para avaliar a eficiência e a reprodutibilidade do método de extração de Folch sob diferentes condições de processamento.

4.2.5 Análises espectroscópicas

As análises por espectroscopia Raman do leite e das gorduras foram registradas em um equipamento FT-Raman Bruker MultiRAM, com laser de Nd:YAG operando a 1064 nm, com resolução espectral de 4 cm^{-1}, faixa espectral de 4000 a 50 cm^{-1}, potência do laser de 500 mW e 512 varreduras.

Para as medidas de espectroscopia no infravermelho, as amostras foram analisadas em um espectrômetro FTIR Bruker, modelo Vertex 70, acoplado a um acessório ATR de diamante. Os espectros foram registrados de 4000 a 400 cm^{-1} com 256 varreduras, em uma resolução de 4 cm^{-1}. Todas as medidas de FTIR e Raman foram realizadas em duplicata, e as duas réplicas foram coletadas em dias distintos para garantir a consistência e reduzir a variabilidade analítica.

4.2.6 Análise estatística

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada para explorar os dados espectrais e identificar padrões relacionados aos perfis lipídicos do leite de diferentes espécies animais. Os modelos de PCA foram construídos utilizando o software MATLAB, versão 7.10 (The MathWorks, Natick, MA, USA), em combinação com o PLS Toolbox, versão 5.2.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Antes da análise, os dados espectrais foram pré-processados para minimizar variações não químicas. As etapas de pré-processamento incluíram a correção de linha de base por Mínimos Quadrados Ponderados (*Weighted Least Squares* - WLS), seguida pela transformação por Variável Normal Padrão (*Standard Normal Variate* - SNV) e Centramento na Média (Mean Centering - MC). Essas etapas foram empregadas para reduzir variações não relacionadas à composição química das amostras e melhorar a qualidade dos dados para a análise multivariada.

4.3 RESULTADOS

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos para a caracterização da gordura de leites de diferentes espécies animais. Inicialmente, são discutidas as características físico-químicas dos leites crus utilizados no estudo. Em seguida, são apresentados os resultados das análises espectroscópicas da fração lipídica por espectroscopia Raman e infravermelho, com foco na identificação das principais bandas e das diferenças observadas entre as espécies. Por fim, é apresentada a PCA, utilizada para avaliar a capacidade das técnicas espectroscópicas em discriminar os diferentes perfis lipídicos.

4.3.1 Caracterização físico-química de diferentes leites

As extrações de gordura foram realizadas em quatorze amostras de leite de quatro espécies: bovina, caprina, ovina e bufalina, incluindo leite submetido a diferentes métodos de processamento, como cru, pasteurizado e UHT. Para as espécies ovina e bufalina, apenas amostras de leite cru foram testadas. Os dados referentes ao pH, teor de cálcio iônico e porcentagem de gordura de cada amostra de leite são apresentados na Tabela 12 abaixo:

Tabela 12 – Características físico-químicas dos leites das diferentes espécies e diferentes processamentos

Amostra de leite	pH	Ca^{2+} mmol L^{-1}	Gordura %
VL	6,67	1,22	4,41
VE	6,75	1,22	2,98
VP	6,72	1,86	3,42
VT1	6,56	0,79	3,58
VT2	6,69	0,67	3,60
VT3	6,68	0,59	4,40
CL	6,73	1,16	3,53
CE	6,73	0,92	3,24
CFSA	6,65	2,34	3,00
CP	6,61	1,10	1,20
CT1	6,59	0,25	3,10

CT2	6,62	0,21	3,50
OV	6,84	1,22	6,30
BU	6,62	0,82	3,75

Valores apresentados para cada código de amostra.

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

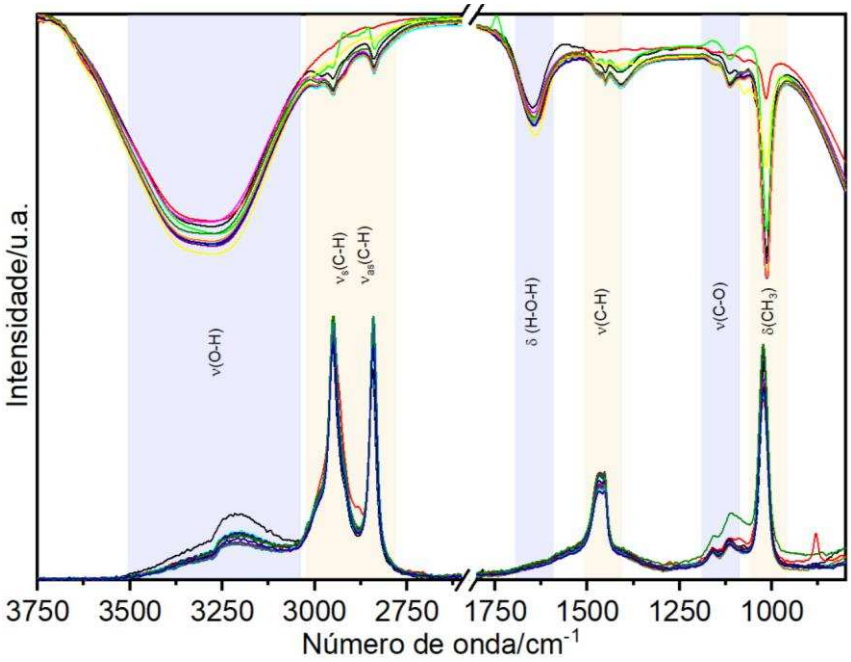
O pH variou de 6,56 a 6,84, indicando caráter levemente ácido e permanecendo próximo da faixa normalmente descrita para o leite fresco, cujo pH é normalmente de aproximadamente 6,7 (Walstra *et al.*, 2005). A concentração de cálcio apresentou valores entre 0,21 mmol L^{-1} a 2,34 mmol L^{-1}, com o maior teor encontrado na amostra CSA (leite de cabra cru). Observa-se que o tipo de tratamento térmico e a adição de agentes quelantes (adicionados ao leite UHT) influenciam a concentração de cálcio. O teor de gordura varia de 1,20% a 6,30%, sendo que o leite de ovelha (OV) apresentou o maior teor de gordura.

4.3.2 Análise Vibracional

Conforme descrito na metodologia, a extração de lipídios foi realizada em amostras de leite de diferentes espécies animais utilizando o método de Folch. Essa extração resultou em três fases distintas: Fase 1, Fase 2 e Fase 3 (Figura 8). A caracterização espectroscópica dessas fases foi realizada utilizando as técnicas Raman e de infravermelho (IV), o que também nos permitiu confirmar a eficiência da extração de Folch. A ausência de bandas relacionadas a lipídios nas Fases 1 e 2, juntamente com a presença de vibrações características de lipídios na Fase 3, demonstra que o método isolou efetivamente a fração lipídica dos componentes polares e proteicos.

Os espectros resultantes, apresentados abaixo, permitiram a identificação dos componentes em cada fase de separação e o perfil lipídico de cada amostra de leite. A análise espectroscópica inicia-se com a Fase 1, cujos espectros Raman e IV são mostrados na Figura 11, e as atribuições de bandas correspondentes são apresentadas na Tabela 13.

Figura 12 – Espectros infravermelho e Raman (λ_0 = 1064 nm) da Fase 1 após a extração da gordura das 14 amostras de leite das diferentes espécies e diferentes processamentos



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Tabela 13 – Tentativa de atribuição das bandas Raman (λ_0 = 1064 nm) e IV da Fase 1 da extração

Número de onda/cm^{-1}		Atribuição
Raman	IV	
3217	3291	ν(O-H)
2951-2840	2950-2834	ν_{as}(C-H), metila (CH_3)
-	1642	δ (H-O-H)
1462	1448	C-H de CH_3
-	1404	δ(C-H) de CH_3
1159	-	ν(C-O)
1118	1114	ν(C-O)
1020	1012	δ(CH_3).

Abreviações: ν estiramento; ν_{as} Estiramento assimétrico; δ Deformação angular.

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

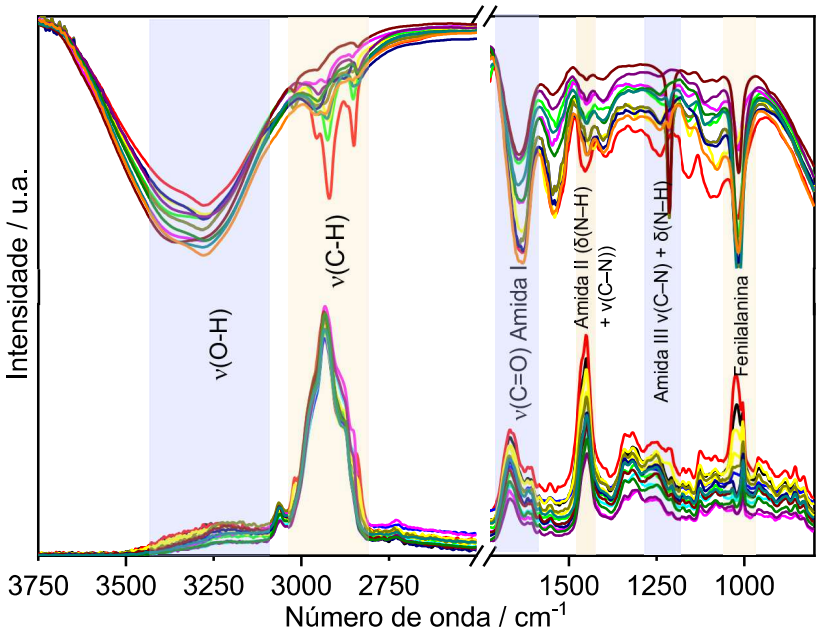
A análise por espectroscopia Raman e no infravermelho da fase aquosa, Fase 1, obtida na extração de Folch permitiu identificar a presença de moléculas polares. As bandas

características de estiramento O-H, observadas em torno de 3291 cm^{-1} no espectro de infravermelho, indicam a presença de grupos hidroxila. A banda de deformação angular da água aparece em torno de 1642 cm^{-1} (Badri; Binet; Lavalley, 1997). A análise Raman também permitiu a identificação de bandas características do metanol, como a banda de estiramento C-O em torno de 1120 cm^{-1} (Emin; Hushur; Mamtimin, 2020).

A presença dessas bandas confirma a presença de metanol na fase aquosa e indica que o processo de extração foi eficiente na remoção desse solvente da fase lipídica. A ausência de bandas associadas às ligações C=O e C-H, típicas de lipídios, confirma que a Fase 1 é constituída principalmente por compostos polares e não contém lipídios.

Em seguida, podemos analisar a Fase 2, ou seja, onde temos as proteínas precipitadas, fazendo também sua análise vibracional. A seguir, temos a Figura 12 e a Tabela 14 com as respectivas atribuições das bandas.

Figura 13 – Espectros infravermelho e Raman (λ_0 = 1064 nm), da Fase 2 após a extração da gordura das 14 amostras de leite das diferentes espécies e diferentes processamentos



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Tabela 14 – Tentativa de atribuição das bandas Raman (λ_0 = 1064 nm) e IV da Fase 2 da extração

Número de onda/ cm^{-1}		Atribuição
Raman	IV	
3250	3275	ν(O-H)
2930-2844	2957-2847	$\nu_{as}(CH_2)$, $\nu_s(CH_2)$, $\nu_{as}(CH_3)$ e $\nu_s(CH_3)$
1664	-	Amida I ν(C=O), com contribuição de ν(C-N)
-	1641	Amida I (ν(C=O))
1616	-	Vibrações do anel aromático de tirosina e fenilalanina
1553	-	Amida II δ(N-H) + ν(C-N)
-	1535	Amida II (δ(N–H) + ν(C–N))
1450	1449	$\delta(CH_2)$ e $\delta(CH_3)$
1343	-	Amida III e deformações C–H
1246	1237	Amida III ν(C–N) + δ(N–H)
1124	1212	ν(C–C)
-	1157	ν(C–O) / ν(C–O–C)
1083	1089	ν(C–O)
1022	1014	ν(C–C), ν(C–N)
1004	1005	Respiração do anel fenila da fenilalanina, com contribuição de ν(C–C)
957	-	Vibrações do esqueleto, principalmente ν(C–C)
854	-	Respiração do anel aromático da tirosina
758	-	Respiração do anel indol do triptofano; δ(CC) + δ(CN)

Abreviaturas: ν estiramento; ν_{as} estiramento assimétrico; ν_s estiramento simétrico; δ deformação angular.

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

A comparação entre os espectros obtidos e os descritos na literatura permitiu identificar bandas características de grupos funcionais associados às proteínas presentes na fase interfacial. Considerando que aproximadamente 80% das proteínas do leite correspondem às caseínas, o

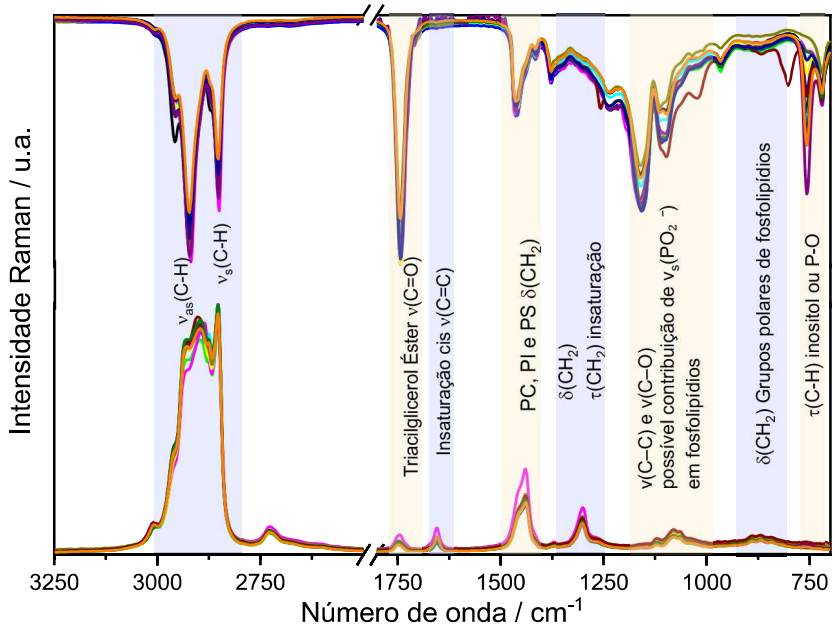
perfil espectral observado mostrou-se compatível com a presença predominante dessas proteínas na Fase 2. Nos espectros de infravermelho, as bandas em torno de 1640 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} foram atribuídas às bandas de Amida I e Amida II, respectivamente. A banda de Amida I está relacionada ao estiramento da ligação C=O das ligações peptídicas, enquanto a banda de Amida II resulta principalmente das vibrações de deformação N-H e estiramento C-N, características da estrutura proteica (Hewavitharana; van Brakel, 1997; Purevsuren, 2003).

Nos espectros Raman, a banda em aproximadamente 1660 cm^{-1} também foi atribuída à Amida I, corroborando os resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho, enquanto a banda em 1004 cm^{-1} é característica da fenilalanina, indicando a presença de resíduos de aminoácidos aromáticos nas proteínas (Rojas-Candelas *et al.*, 2022; Zhuang *et al.*, 2015).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a fase interfacial concentrou predominantemente proteínas, em concordância com a composição esperada para essa fração após a extração pelo método de Folch, corroborando o adequado isolamento da fração lipídica na fase orgânica.

Por fim, foi feita a análise da Fase 3, onde se encontra a fração lipídica, como mostra a Figura 13. As atribuições se encontram na Tabela 15.

Figura 14 – Espectros infravermelho e Raman (λ_0 = 1064 nm) da Fase 3 após a extração da gordura das 14 amostras de leite das diferentes espécies e diferentes processamentos



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Tabela 15 – Tentativa de atribuição das bandas Raman (λ_0 = 1064 nm) e IV da Fase 3 da extração

Número de onda/cm^{-1}		Atribuição
Raman	IV	
2960	2958	$\nu_{as}(CH_3)$
2914-2855	2920-2847	$\nu_{as}(CH_2)$, $\nu_s(CH_2)$, $\nu_{as}(CH_3)$ e $\nu_s(CH_3)$
1751	1735	ν(C=O) de grupos éster dos triacilgliceróis
1655	-	ν(C=C) insaturação cis
1450	1464	$\delta(CH_2)$
1369	1379	$\tau(CH_3)$
1304	1318	$\delta(CH_2)$
1263	1260	δ(=C–H) no plano
1144	1158	ν(C–C) e ν(C–O) do esqueleto lipídico
1123	-	ν(C–C) das cadeias alifáticas
1065	1097	ν(C-C) fosforil
891-816	909-846	Bandas atribuídas a vibrações de grupos fosfato e/ou cabeça polar de fosfolipídios

Abreviaturas: ν estiramento; ν_{as} estiramento assimétrico; ν_s estiramento simétrico; δ deformação angular; τ torção (twisting).

A fase lipídica obtida após a extração também foi analisada por espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho com o objetivo de caracterizar a composição e a estrutura molecular dos lipídios presentes. As bandas de estiramento da carbonila de éster ν(C=O), observadas em torno de 1750 cm^{-1} nos espectros Raman e de 1735 cm^{-1} nos espectros de infravermelho, são características de triacilgliceróis, indicando que a fase orgânica obtida é constituída por lipídios esterificados (Gallier *et al.*, 2011; Kitt *et al.*, 2018).

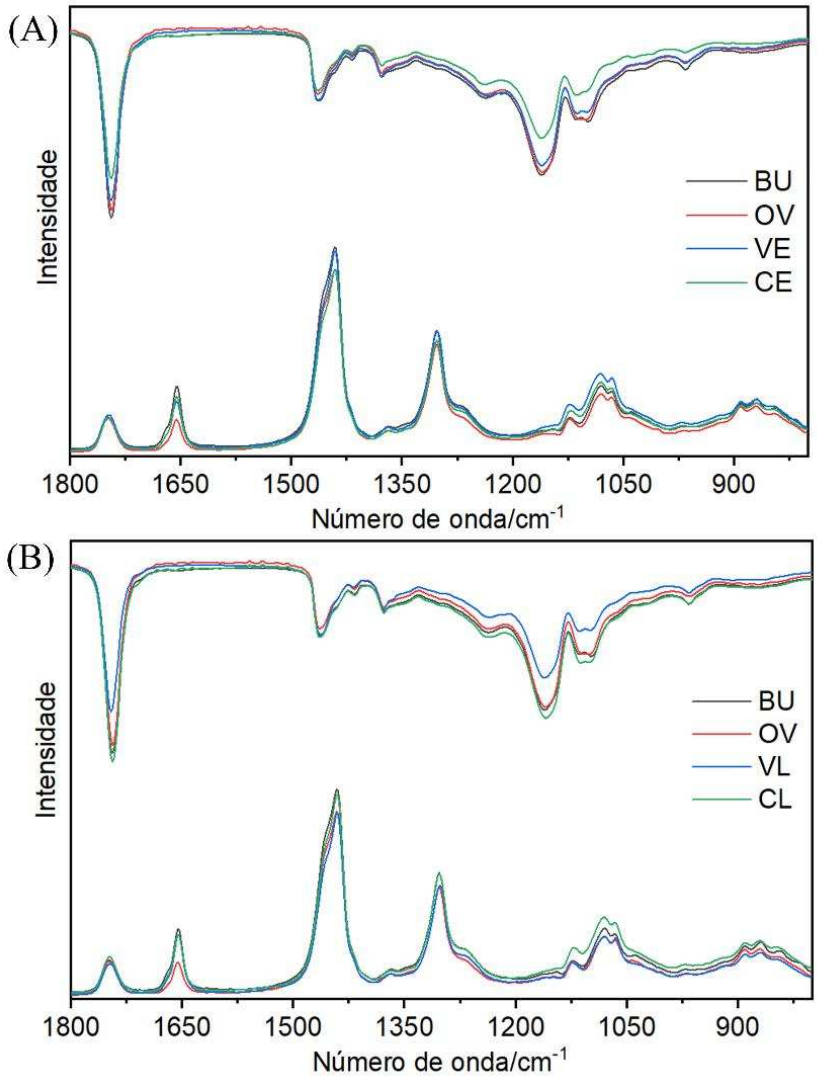
Na região entre 1100 e 1300 cm^{-1}, observam-se bandas atribuídas principalmente às vibrações de estiramento C–O e C–C dos triacilgliceróis, além de contribuições associadas às cadeias alifáticas dos ácidos graxos. Nos espectros Raman, a banda em torno de 1655 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=C de ácidos graxos insaturados na configuração cis (Akhgar *et al.*, 2021). As bandas próximas de 2850 e 2920 cm^{-1} correspondem aos modos de estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H dos grupos metileno (CH_2), característicos das cadeias de ácidos graxos (Stefanov *et al.*, 2011).

A análise espectral das três fases obtidas após a extração, em conjunto com o método de Folch, permitiu caracterizar os principais constituintes presentes em cada fração. A separação entre as fases aquosa, orgânica e interfacial possibilitou o isolamento da fração lipídica de amostras de leite cru e de leites submetidos ao processamento térmico provenientes de diferentes espécies animais. As espectroscopias Raman e no infravermelho forneceram informações complementares sobre os grupos funcionais presentes em cada fase, permitindo comparar as assinaturas vibracionais das diferentes frações obtidas após a extração. Nas seções seguintes, a PCA empregada para avaliar os conjuntos de dados espectrais obtidos por Raman e infravermelho, o que permitiu comparar as assinaturas vibracionais das diferentes frações obtidas após a extração (Almeida *et al.*, 2012).

4.3.3 Análise das componentes principais para as gorduras

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para discriminar os perfis espectrais dos lipídios apenas dos leites crus, das espécies vaca (VE e VL), cabra (CE e CL), ovelha (OV) e búfala (BU). Ao reduzir a dimensionalidade dos dados espectroscópicos, a técnica permite identificar agrupamentos distintos de amostras, cada um correspondente a uma espécie específica. Veremos a seguir, Figura 14A e 14B, através dos resultados obtidos a eficiência da PCA em distinguir as diferentes espécies através da identificação de marcadores lipídicos característicos.

Figura 15 – Espectros Raman e no infravermelho referentes às gorduras extraídas dos leites de vaca, cabra, ovelha e búfala, com laser em 1064 nm

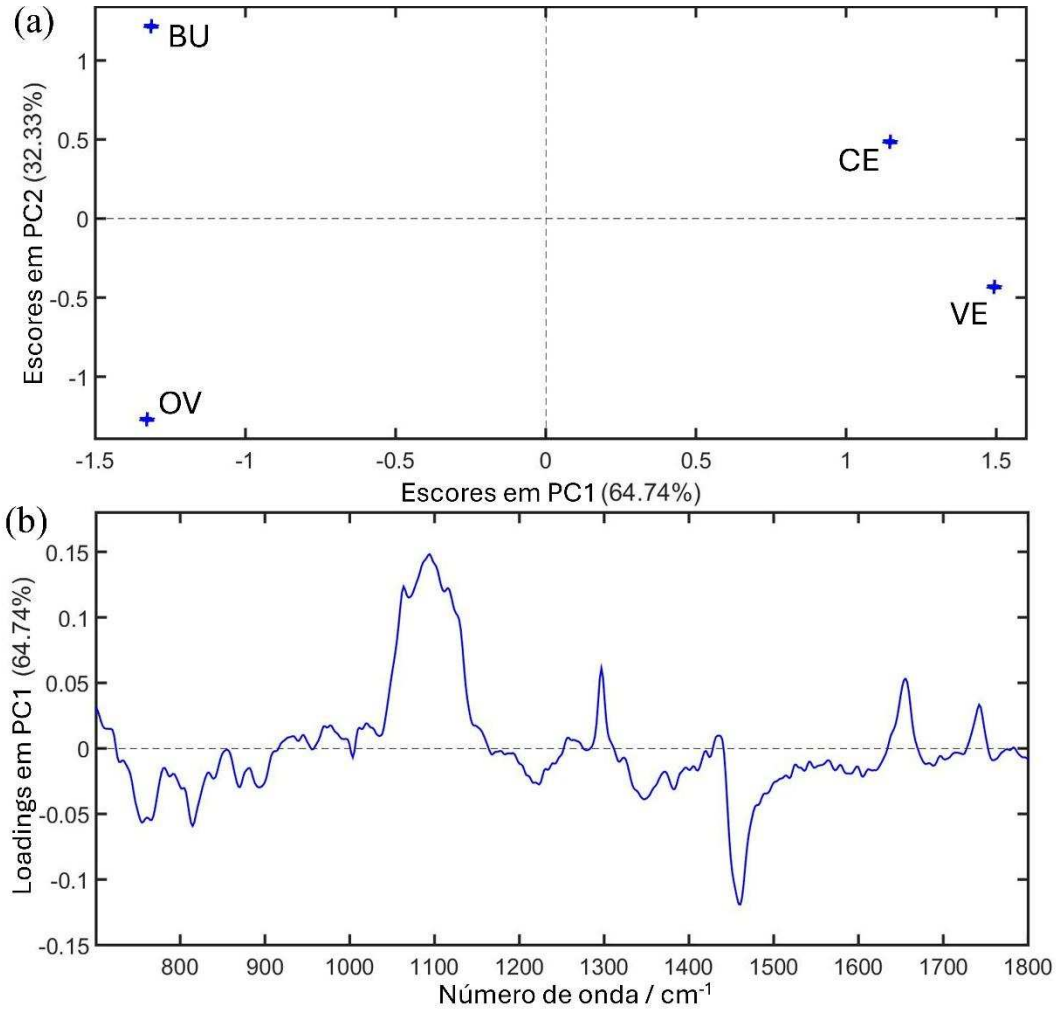


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

4.3.3.1 Análise de componentes principais (PCA) dos perfis lipídicos de leites de diferentes espécies por espectroscopia Raman

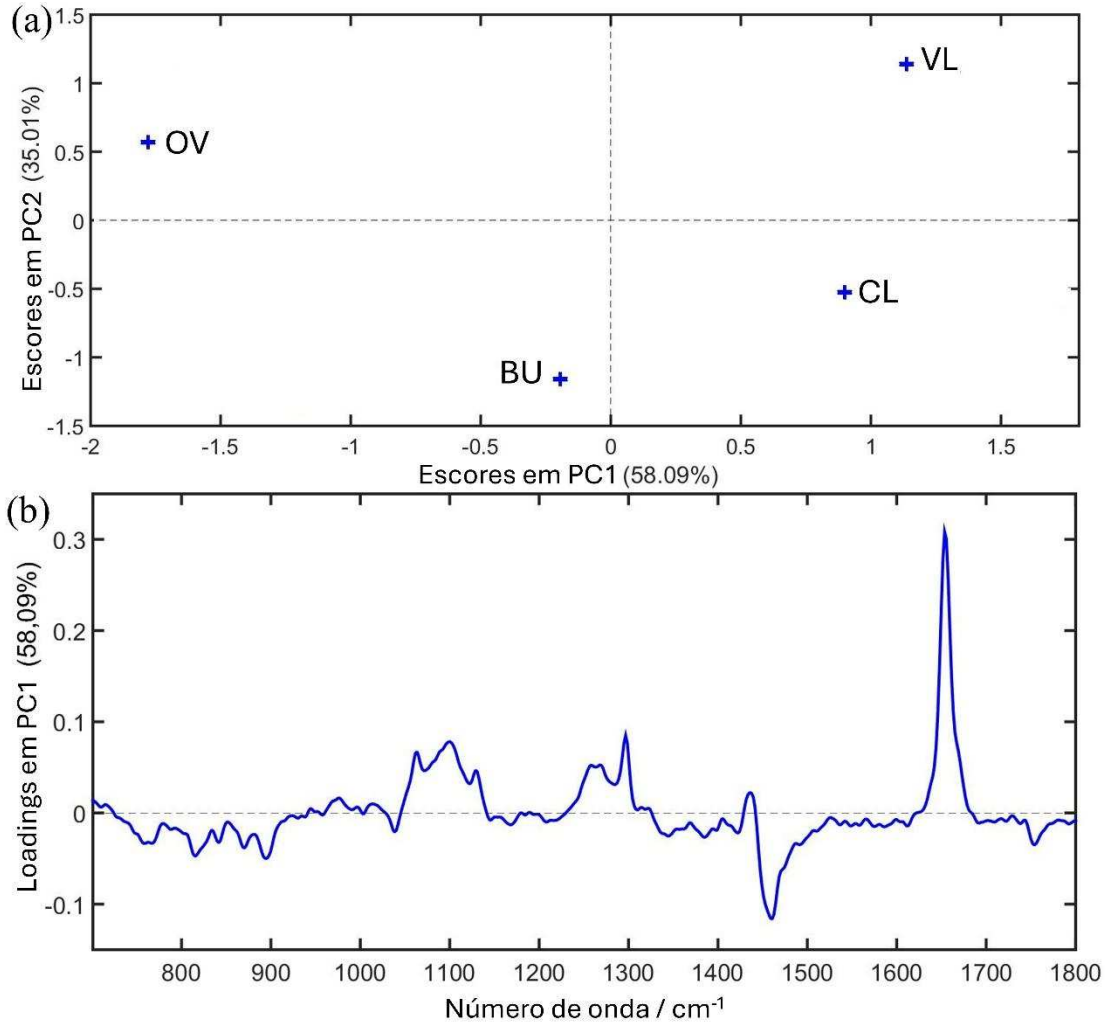
Na Figura 15, que inclui amostras de gordura do leite de búfala (BU) e ovelha (OV) da região de Paraíba do Sul, e de vaca (VE) e cabra da EMBRAPA (CE), e na Figura 16, onde as amostras de vaca (VL) e cabra (CL) são provenientes do bairro Linhares, Juiz de Fora, a separação das gorduras entre as diferentes espécies foi clara. Em ambas as figuras, os *loadings* da primeira componente principal (PC1) destacaram as regiões espectrais que mais contribuíram para essa diferenciação.

Figura 16 – (a) *Scores* da PCA dos espectros Raman das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CE) e vaca (VE); (b) *loadings* da PCA



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura 17 – (a) *Scores* da PCA dos espectros Raman das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CL) e vaca (VL); (b) *loadings* da PCA



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na espectroscopia Raman, a análise de componentes principais (PCA) separou as amostras da fração lipídica com base na espécie. Em ambos os modelos (Figuras 15 e 16), as amostras de búfala e ovelha posicionaram-se no lado negativo de PC1, enquanto as amostras de vaca e cabra apareceram no lado positivo. A distribuição dos *scores* das amostras na Figura 15A explica 97,07% da variabilidade total dos dados (64,74% para PC1 e 32,33% para PC2), enquanto na Figura 16A, as duas primeiras componentes respondem por 93,10% da variância (58,09% para PC1 e 35,01% para PC2). Esse padrão consistente de separação indica diferenças nos perfis lipídicos entre as espécies avaliadas.

As regiões espectrais responsáveis por essa separação variaram entre os conjuntos de dados. Na Figura 15B, a banda em 1123 cm^{-1} apresentou a maior contribuição positiva para PC1, enquanto na Figura 16B, a região em torno de 1655 cm^{-1} foi mais decisiva. Ambas as

bandas foram associadas às amostras de vaca e cabra. A banda em 1123 cm^{-1} corresponde ao estiramento C – C em cadeias alifáticas de ácidos graxos e pode receber contribuições de fosfolipídios, uma vez que bandas relacionadas a ligações P-O aparecem nessa região (Gaber; Yager; Peticolas, 1978; Sakkas; Pappas; Moatsou, 2021; Smith *et al.*, 2017). A banda em 1655 cm^{-1} é atribuída ao estiramento ν(C=C) de ácidos graxos insaturados e foi fundamental para a diferenciação na Figura 16 (Almeida *et al.*, 2011; Czamara *et al.*, 2015).

Em contrapartida, a banda em 1455 cm^{-1}, associada às vibrações de deformação angular do tipo tesoura (Czamara *et al.*, 2015; Mendes *et al.*, 2016), apresentou *loadings* negativos em PC1 em ambos os conjuntos de dados, estando relacionada às amostras da fração lipídica dos leites de búfala e de ovelha. Esse comportamento indica uma relação inversa entre a contribuição dessa banda e aquelas observadas em 1123 e 1655 cm^{-1}, associadas às amostras de vaca e de cabra. A contribuição negativa da banda em 1455 cm^{-1} pode estar relacionada a diferenças na composição e na organização molecular das cadeias lipídicas entre as espécies. Essas observações estão de acordo com as diferenças no perfil de ácidos graxos e na composição lipídica descritas para os leites de vaca, cabra, ovelha e búfala (Akhgar *et al.*, 2021; Sakkas; Pappas; Moatsou, 2021; Wang *et al.*, 2023). Dessa forma, a separação observada na PCA obtida por espectroscopia Raman provavelmente reflete o efeito combinado dessas características estruturais sobre a resposta espectral da fração lipídica, corroborando o potencial da técnica para diferenciar os perfis lipídicos de diferentes espécies.

Além do papel predominante da PC1 na separação das espécies, a PC2 também contribuiu, principalmente ao capturar diferenças entre as amostras de leite de vaca e de cabra de diferentes origens geográficas (EMBRAPA e Linhares). Embora a PC2 tenha respondido por uma parcela menor da variância, as bandas contribuintes podem estar relacionadas a variações secundárias nos perfis lipídicos potencialmente associadas a fatores como dieta, raça ou condições ambientais.

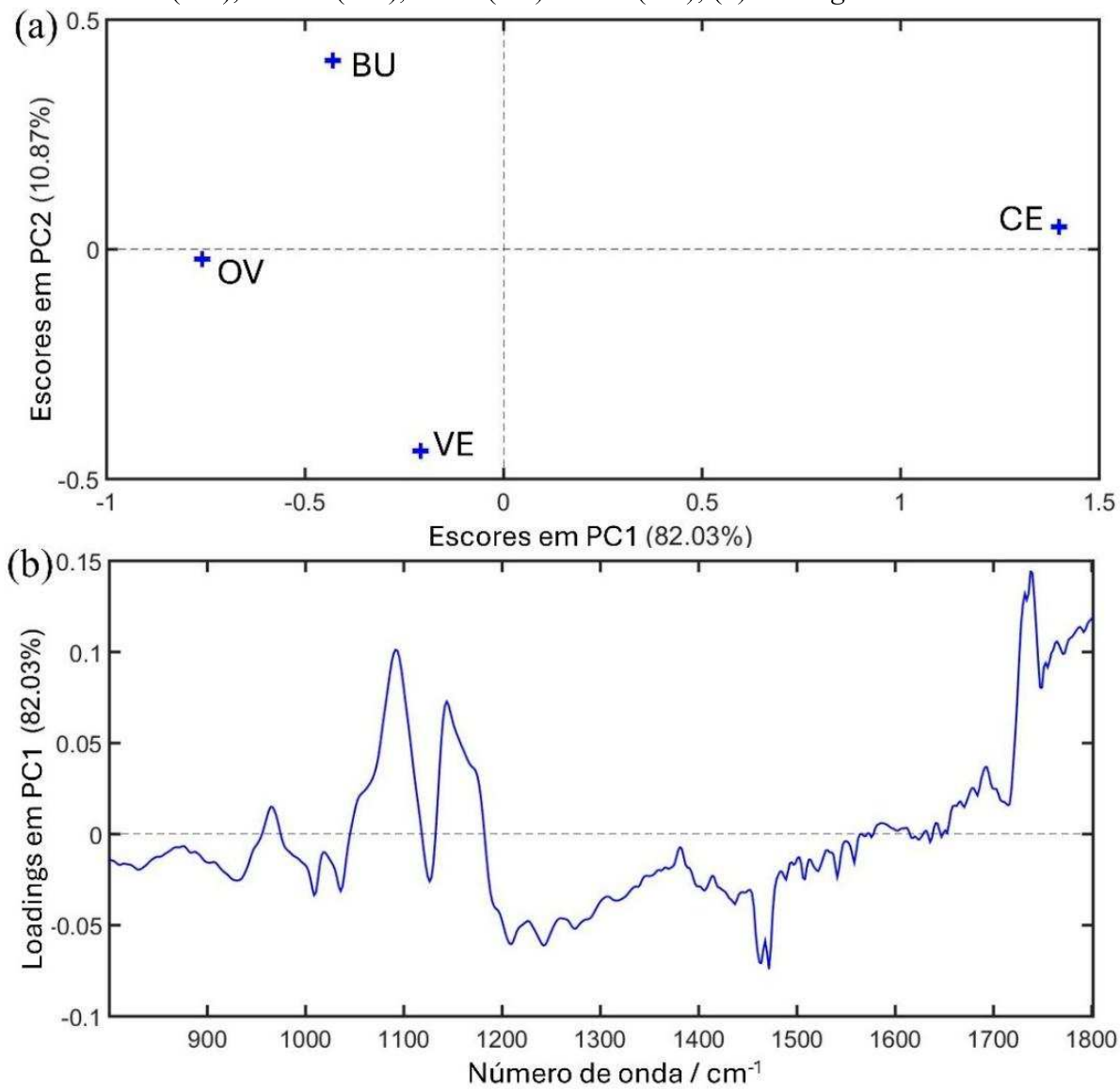
Tomados em conjunto, esses resultados reforçam o potencial da espectroscopia Raman combinada com PCA como um método rápido e não destrutivo para caracterizar a composição lipídica do leite e para o desenvolvimento de modelos de classificação baseados na espécie animal e na origem regional.

4.3.3.2 Análise de componentes principais (PCA) dos perfis lipídicos de leites de diferentes espécies por espectroscopia no infravermelho

Além da análise Raman, a espectroscopia no infravermelho também foi aplicada para a diferenciação dos perfis lipídicos das gorduras de leite das diferentes espécies animais. As Figuras 17 e 18 demonstram que, assim como no caso da espectroscopia Raman, a PCA aplicada aos espectros infravermelhos resultou em uma separação das amostras de búfala, ovelha, vaca e cabra.

Os dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2, juntos explicam uma alta proporção da variabilidade total dos dados (92,90% na Figura 17 e 97,54% na Figura 18). A distribuição das amostras ao longo de PC1 evidencia diferenças espectrais entre as espécies. Em ambos os modelos, as amostras de búfala e de ovelha permaneceram no lado negativo de PC1, enquanto as amostras de vaca e de cabra ocuparam posições diferentes entre os dois conjuntos de dados.

Figura 18 – (a) *Scores* da PCA dos espectros no infravermelho das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CE) e vaca (VE); (b) *loadings* da PCA

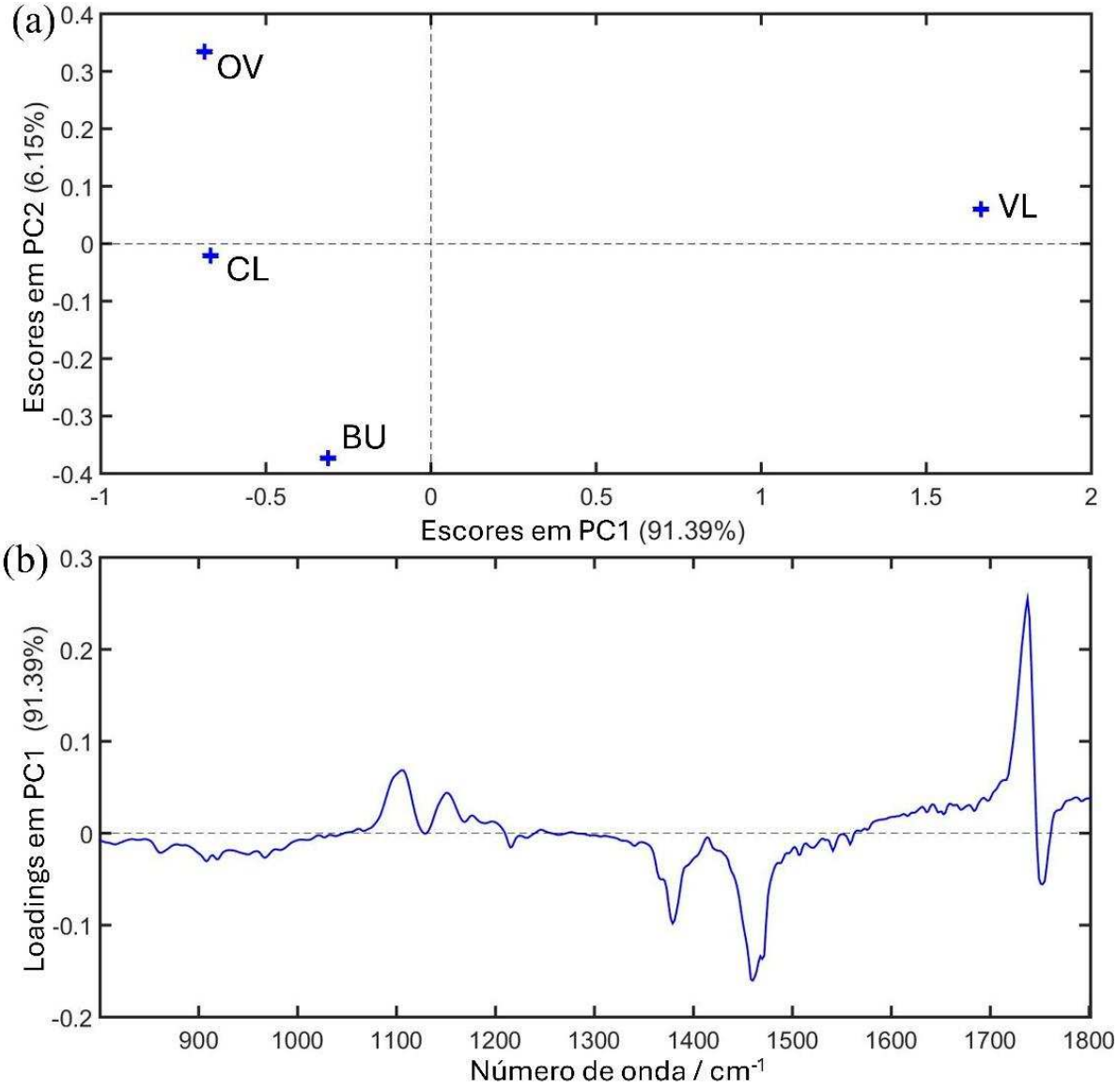


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise de componentes principais (PCA) aplicada aos espectros no infravermelho das gorduras do leite (Figuras 17 e 18) mostrou que a região em torno de 1750 cm^{-1} apresentou a maior contribuição para a separação das espécies ao longo de PC1. Essa banda é atribuída ao estiramento da ligação C=O dos grupos éster presentes nos lipídios. Considerando que a composição da fração lipídica difere entre os leites das diferentes espécies, conforme descrito na literatura, a maior contribuição dessa região pode estar relacionada às variações na distribuição de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, bem como ao grau de insaturação e à presença de ácidos graxos trans e conjugados, características influenciadas por fatores

genéticos e nutricionais (Akhgar *et al.*, 2021; Cruz *et al.*, 2016; Sakkas; Pappas; Moatsou, 2021).

Figura 19 – (a) *Scores* da PCA dos espectros no infravermelho das gorduras do leite de búfala (BU), ovelha (OV), cabra (CL) e vaca (VL); (b) *loadings* da PCA



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

As diferenças na composição da fração lipídica entre as espécies podem explicar a separação observada na PCA dos espectros no infravermelho. Estudos demonstram que o leite de vaca apresenta maiores proporções de ácidos graxos de cadeia longa, como os ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1), enquanto os leites de cabra e de ovelha contêm maiores concentrações de ácidos graxos de cadeia curta e média. O leite de búfala, por sua vez,

caracteriza-se pelo maior teor de ácidos graxos saturados, com predominância dos ácidos palmítico e esteárico (Amores; Virto, 2019; Ong *et al.*, 2021).

Considerando essas diferenças composicionais, é provável que a contribuição da região em torno de 1750 cm^{-1} reflita variações na composição dos triacilgliceróis entre as espécies, evidenciando diferenças previamente descritas para o perfil de ácidos graxos desses leites.

As diferenças nas intensidades das bandas observadas nos espectros vibracionais também podem ser associadas ao teor de gordura de cada tipo de leite, uma vez que essas variações afetam diretamente as assinaturas espectrais. Leites com maiores porcentagens de gordura podem exibir bandas de estiramento C = O e C = C mais intensas devido à maior presença de estruturas de ésteres e lipídios insaturados, respectivamente (Bandyopadhyay; Verma; Saha, 2025; Gallier *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2016).

4.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS

A caracterização das gorduras dos leites de vaca, cabra, ovelha e búfala por espectroscopia vibracional, associada à análise de componentes principais, mostrou-se uma abordagem eficiente para evidenciar diferenças entre os perfis lipídicos das espécies avaliadas. As espectroscopias Raman e no infravermelho permitiram identificar regiões espectrais de maior relevância para a diferenciação das amostras, demonstrando o potencial dessas técnicas para a caracterização rápida e não destrutiva de gorduras.

Na espectroscopia Raman, a PCA evidenciou a separação das espécies principalmente em função das bandas localizadas em 1123, 1455 e 1655 cm^{-1}. As bandas em 1123 e 1655 cm^{-1} apresentaram maior contribuição positiva para a separação das amostras de vaca e cabra, sendo atribuídas, respectivamente, ao estiramento C–C das cadeias alifáticas e ao estiramento C=C de ácidos graxos insaturados. Em contrapartida, a banda em 1455 cm^{-1}, relacionada às vibrações de deformação angular dos grupos CH_2, apresentou contribuição na parte negativa da PCA, estando associada às amostras de búfala e ovelha.

Nos espectros de infravermelho, a PCA indicou que a região em torno de 1750 cm^{-1}, atribuída ao estiramento C=O dos grupos éster presentes nos triacilgliceróis, foi a principal responsável pela diferenciação entre as espécies. Esse resultado sugere que diferenças na composição da fração lipídica influenciaram a resposta espectral observada.

As diferenças identificadas por ambas as técnicas são compatíveis com as variações na composição lipídica descritas na literatura para os leites das diferentes espécies, incluindo

diferenças na distribuição dos ácidos graxos, no grau de saturação e na composição dos triacilgliceróis. Assim, a separação observada pela PCA provavelmente reflete o efeito combinado dessas características estruturais sobre os espectros obtidos. De modo geral, os resultados demonstram que a espectroscopia Raman e a espectroscopia no infravermelho, associadas à análise multivariada, constituem ferramentas promissoras para a caracterização, classificação e autenticação de gorduras lácteas provenientes de diferentes espécies animais, com potencial de aplicação no controle de qualidade da cadeia produtiva de leite e derivados (Oliveira, 2026).

5 ESPECTROSCOPIA RAMAN ASSOCIADA À QUIMIOMETRIA NA ANÁLISE DE QUEIJOS MINAS FRESCAL ARTESANAIS E INDUSTRIAIS DO BRASIL

Nesta seção são apresentados o estudo espectroscópico de queijos Minas Frescal industriais e artesanais e a avaliação das alterações ocorridas durante o armazenamento sob refrigeração e em temperatura ambiente.

5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

O queijo Minas Frescal é um dos produtos lácteos mais consumidos no Brasil. Caracteriza-se pela alta umidade, ausência de maturação e elevada perecibilidade. Sua composição físico-química, com teores de umidade entre 55% e 58%, gordura entre 17% e 19% e pH em torno de 5,0 a 5,3, faz com que o produto seja mais suscetível a alterações durante o armazenamento, o que pode comprometer sua qualidade e segurança (Dagostin; Carpine; Masson, 2013; Sant'Ana *et al.*, 2013; Silva, 2005). Além da importância nutricional, o queijo Minas Frescal também possui relevância econômica e social para pequenos produtores, devido à simplicidade do processo de fabricação e ao baixo investimento necessário para sua produção (Oliveira *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019).

As diferenças entre os queijos Minas Frescal industriais e artesanais decorrem do modo de produção e do grau de padronização empregado. Os queijos artesanais são produzidos por métodos mais tradicionais, com maior participação das etapas manuais e, em muitos casos, sem pasteurização do leite e com pouca mecanização do processo (Costa *et al.*, 2022). Já na produção industrial, o leite é submetido à pasteurização e ao preparo para coagulação, etapas que incluem a adição de culturas láticas selecionadas e de cloreto de cálcio, contribuindo para maior controle do processo de fabricação (Sangaletti *et al.*, 2009; Silva, 2005).

Essas diferenças também influenciam o processo de sinérese, responsável pela liberação de soro durante a fabricação do queijo. Na produção industrial, a massa é submetida à prensagem mecânica para favorecer a remoção do soro, enquanto nos queijos artesanais essa etapa ocorre por gravidade (Silva *et al.*, 2019). Como consequência, os produtos apresentam diferenças na retenção de umidade e na textura, sendo a sinérese, em geral, mais intensa nos queijos artesanais. Os queijos industriais costumam apresentar maior padronização e maior conformidade com a legislação (Dias *et al.*, 2016), embora ainda possam ser alvo de fraudes econômicas, como a adição ilegal de soro de leite, prática que altera o perfil proteico do produto e pode conferir características semelhantes às da ricota (Magenis *et al.*, 2014).

Os queijos artesanais, por sua vez, tendem a apresentar maior variação em parâmetros como pH, umidade e teor de sal, refletindo diferenças na matéria-prima e um menor controle das etapas de fabricação. Mesmo com o avanço da industrialização, a produção de queijo Minas Frescal ainda é frequentemente realizada em pequenas e médias unidades, nas quais diversas etapas permanecem dependentes do manejo humano (Dagostin; Carpine; Masson, 2013). Essas diferenças de processamento influenciam as características físico-químicas do produto e podem afetar sua organização estrutural e sua estabilidade durante o armazenamento.

Durante o armazenamento, o queijo Minas Frescal sofre transformações bioquímicas, físicas e microbiológicas. Entre elas, destacam-se a lipólise e a proteólise, processos que modificam a organização da matriz do alimento e afetam propriedades como sabor, odor e textura (Sangaletti *et al.*, 2009; Tarakci; Kucukoner, 2006). Devido ao alto teor de umidade e à atividade microbiana, essas mudanças podem ocorrer rapidamente, reduzindo a vida útil do produto e favorecendo a proliferação de microrganismos (Feitosa *et al.*, 2016; Scudino *et al.*, 2023).

A espectroscopia vibracional tem sido amplamente utilizada na caracterização de produtos lácteos por fornecer informações moleculares de forma rápida, não destrutiva e com reduzido preparo de amostra. Entre as técnicas mais empregadas estão a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia Raman (Mohammadi *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2021) A espectroscopia Raman é sensível à fração lipídica, permitindo identificar alterações estruturais e avaliar a autenticidade de produtos por meio de bandas características associadas aos grupos CH_2 e CH_3. A técnica também pode ser utilizada para acompanhar mudanças nas fases lipídica e proteica decorrentes de tratamentos térmicos (Acharya; Nair; Abdul Salam, 2026; Zhang; Su; Xiong, 2025).

O uso combinado da espectroscopia vibracional e da quimiometria vem sendo empregado na caracterização de produtos lácteos, na detecção de adulterações e no controle de qualidade, mostrando potencial como ferramenta de apoio no combate às fraudes econômicas (Feeney; Guinee; Fox, 2002; Pastorino; Hansen; McMahon, 2003; Pereira *et al.*, 2001).

Apesar do aumento do número de estudos utilizando técnicas espectroscópicas em produtos lácteos, não foram encontrados, até o momento, trabalhos que empreguem a espectroscopia Raman para investigar a estrutura do queijo Minas Frescal, incluindo a comparação entre produtos industriais e artesanais e as mudanças ocorridas durante o armazenamento. A falta de estudos nessa área dificulta a compreensão das diferenças estruturais entre esses produtos e limita a aplicação da espectroscopia Raman na caracterização e no controle de qualidade desse queijo. Neste trabalho, amostras de queijo Minas Frescal de origem

industrial e artesanal foram investigadas por espectroscopia Raman associada à PCA, com o objetivo de diferenciar os sistemas de produção e acompanhar as mudanças estruturais ao longo do armazenamento, relacionando essas alterações às características do processamento e à perda de qualidade do produto.

5.2 METODOLOGIA

Nesta seção são apresentados os procedimentos experimentais utilizados para a caracterização e avaliação de queijos Minas Frescal industriais e artesanais. São descritos a obtenção das amostras, as análises físico-químicas e espectroscópicas realizadas, bem como o delineamento experimental empregado para a comparação entre os diferentes tipos de queijo e para o estudo de sua degradação durante o armazenamento.

5.2.1 Aquisição das Amostras

Quatorze amostras de queijo Minas Frescal foram adquiridas, incluindo produtos industriais e artesanais, comercializados em municípios da Zona da Mata Mineira, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram obtidas em feiras livres, supermercados e diretamente de produtores locais nos municípios de Juiz de Fora, Bicas e Guarará.

5.2.2 Análise Físico-Química

As análises físico-químicas realizadas incluíram a determinação do pH, da concentração de cálcio iônico, do teor de proteína total e do teor de gordura total das amostras de queijo Minas Frescal.

5.2.2.1 Determinação de pH

Uma massa de 10 g de amostra foi misturada com 10 mL água deionizada e agitada até a completa homogeneização. Após um período de repouso de 10 minutos para equilíbrio da fase

aquosa, a mistura foi filtrada. O pH do filtrado resultante foi medido à temperatura ambiente utilizando um pHmetro digital (Gehaka, modelo PG1400). Antes da análise, o instrumento foi calibrado com soluções tampão padrão de pH 4,0 e 7,0.

5.2.2.2 Determinação de Cálcio

A concentração de íons cálcio (Ca^{2+}) foi determinada utilizando o filtrado obtido durante a determinação do pH. Alíquotas da solução foram aplicadas diretamente sobre o sensor de um medidor de íons LAQUAtwin (HORIBA). O equipamento foi previamente calibrado utilizando soluções padrão de cálcio com concentrações de 150 e 2000 ppm.

5.2.2.3 Teor de Proteína

A determinação do teor de proteína total nas amostras de queijo Minas Frescal foi conduzida de acordo com as diretrizes de Wolfschoon-Pombo (1980) e Pereira (2001). O procedimento experimental iniciou-se com a pesagem de aproximadamente 0,2 g de amostra, que foi transferida para tubos de digestão juntamente com 1,6 g de mistura catalisadora e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa mistura foi submetida a uma rampa de aquecimento gradual em um bloco digestor, de 100 °C a 400 °C por cerca de 3,5 horas, até que a combustão completa da matéria orgânica fosse alcançada.

Após o resfriamento, a amostra foi destilada com hidróxido de sódio (NaOH) 50% para a liberação da amônia, que foi capturada em uma solução de ácido bórico e titulada com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L, previamente padronizado. O cálculo do nitrogênio total (N_{total}) foi inicialmente baseado na diferença entre o volume de HCl utilizado na titulação da amostra ($V_{amostra}$) e o volume utilizado no teste em branco (V_{branco}), aplicando a seguinte equação:

$$N_{total} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 0.014}{m} \cdot 100 \quad \text{Equação 11}$$

Nesta equação, V_a representa o volume de HCl utilizado na titulação da amostra (mL), V_b, o volume utilizado no ensaio em branco (mL), M, corresponde à concentração molar do HCl (mol L^{-1}) e m refere-se à massa da amostra (g). O fator 0,014 corresponde à massa, em gramas, de um mmol de nitrogênio (14 g mol^{-1}), sendo utilizado para converter a quantidade de matéria de nitrogênio determinada na titulação em massa de nitrogênio presente na amostra.

Finalmente, o teor de proteína bruta foi obtido multiplicando o resultado anterior pelo fator de conversão (F) de 6,25, conforme demonstrado abaixo:

$$\text{Proteína}(\%) = N_{total} \cdot 6.25 \quad \text{Equação 12}$$

5.2.2.4 Determinação de Gordura

O teor de gordura foi determinado utilizando o método de Van Gulik. Resumidamente, 3 g da amostra de queijo foram colocadas em um butirômetro de Van Gulik, seguido pela adição de 5 mL de água destilada e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi vigorosamente agitada e colocada alternadamente em banho-maria mantido a 60 - 65 °C. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de álcool isoamílico. A mistura foi então centrifugada para promover a separação da gordura, permitindo que a camada lipídica se acumulasse na parte superior do butirômetro, onde foi posteriormente quantificada por leitura direta (Pereira *et al.*, 2001).

5.2.3 Espectroscopia Raman

As análises dos queijos foram realizadas em um espectrômetro FT-Raman Bruker MultiRam, com laser de Nd:YAG operando a 1064 nm, com resolução espectral de 4 cm^{-1}, faixa espectral de 4000 a 50 cm^{-1}, potência do laser de 350 mW e 512 varreduras (scans) acumuladas.

5.2.4 Estudo dos Diferentes Modos de Produção (Artesanal e Industrial) do Queijo Minas Frescal

O estudo comparativo entre os modos de produção artesanal e industrial do queijo Minas Frescal foi realizado com base nas análises físico-químicas e espectroscópicas de 14 amostras (n = 14), sendo sete amostras de queijo artesanal e sete amostras de queijo industrial. As análises físico-químicas incluíram a determinação de pH, cálcio iônico, gordura total e proteína total. Posteriormente, as amostras foram avaliadas por espectroscopia Raman, e os dados obtidos foram submetidos à análise quimiométrica.

5.2.5 Estudo da Degradação de Queijos Minas Frescal Refrigerados e à Temperatura Ambiente

A avaliação da degradação foi conduzida utilizando amostras de queijo Minas Frescal de origem artesanal e industrial, com o objetivo de comparar o comportamento desses produtos sob diferentes condições de armazenamento. Inicialmente, as amostras foram mantidas sob refrigeração (≈ 4 °C) e analisadas por espectroscopia Raman, com análises realizadas em triplicata, ao longo do tempo nos intervalos de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias de armazenamento para entender o processo de degradação refrigerada.

Em paralelo, foi realizado o estudo da degradação sob condições ambientais, no qual uma amostra de queijo foi mantida exposta em uma bancada, sem controle de temperatura, para simular condições mais severas de deterioração. As análises foram conduzidas ao longo do período experimental por espectroscopia Raman, sendo realizadas uma vez por mês, em triplicata, permitindo a comparação entre os processos de degradação sob refrigeração e à temperatura ambiente.

O monitoramento experimental foi realizado ao longo de quatro meses, iniciando em agosto e terminando em novembro, para avaliar possíveis variações associadas ao tempo de armazenamento e às condições ambientais.

2.6 Análise de Componentes Principais

Os modelos de PCA foram executados utilizando o software MATLAB, versão 7.10 (The Math Works, Natick, MA, USA), e o pacote PLS toolbox, versão 5.2.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, USA). Os dados passaram por uma etapa de pré-processamento que consistiu em correção de linha de base por WLS (*weighted least squares* - mínimos quadrados ponderados), SNV (*standard normal variate* - variação normal padrão) e MC (*mean centering* - centramento na média).

A PCA foi empregada como uma ferramenta exploratória não supervisionada, permitindo a identificação das principais fontes de variabilidade sem a imposição de classes pré-definidas. Considerando o número limitado de amostras independentes e a alta dispersão intra-grupo, refletida pelo espalhamento das amostras dentro dos grupos industrial e artesanal no gráfico de *scores* da PCA, a aplicação de métodos supervisionados poderia aumentar o risco de *overfitting* (sobreajuste) e, portanto, não foi adotada neste estudo.

5.3 RESULTADOS

Os resultados deste estudo são apresentados nas subseções a seguir, iniciando pela caracterização físico-química das amostras, seguida das análises espectroscópicas e da interpretação quimiométrica dos dados.

5.3.1 Caracterização Físico-Química de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais

A avaliação dos parâmetros físico-químicos, incluindo pH, cálcio iônico, gordura total e proteína total, de queijos Minas Frescal industriais e artesanais mostrou diferenças tanto na composição quanto nas relações entre esses constituintes (Figura 19).

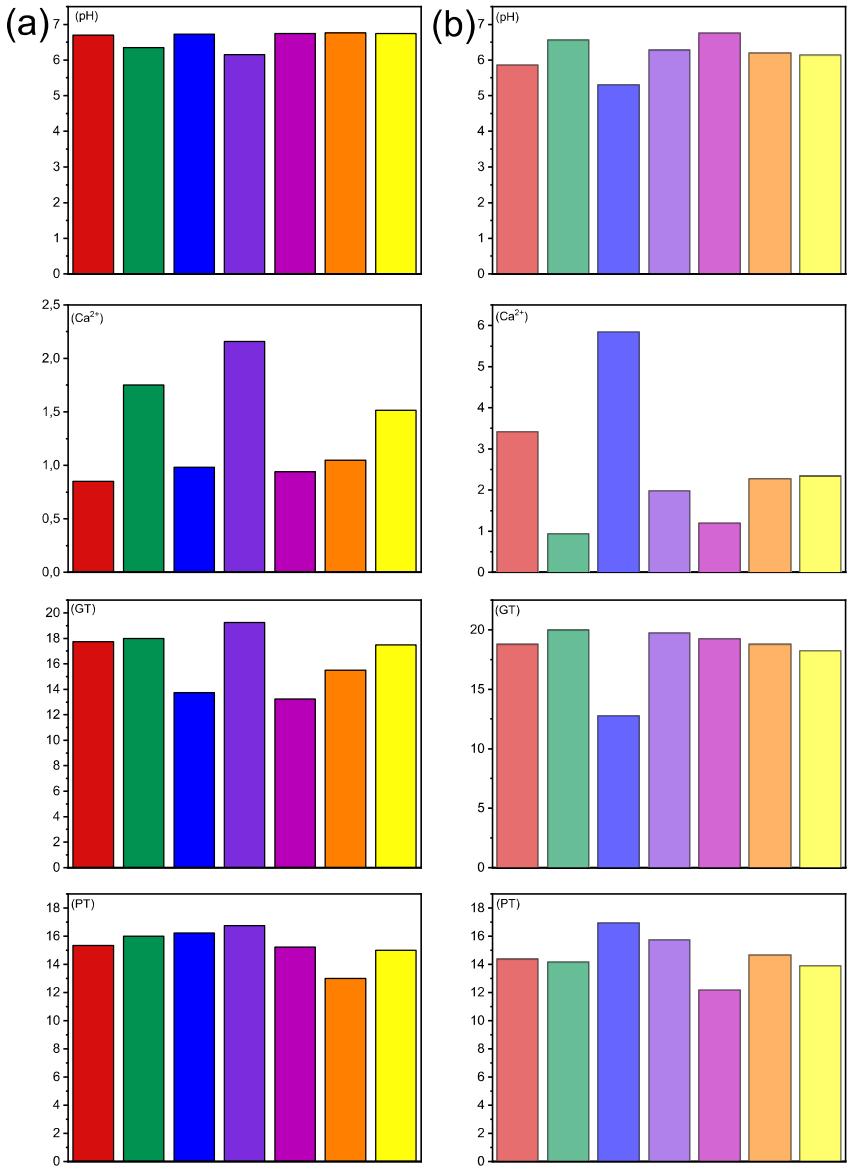
Nos queijos industriais, observou-se menor variação entre as amostras, com o pH variando em uma faixa estreita de 6,15 a 6,76, gordura total (GT) entre 13,25% e 19,25%, cálcio iônico (Ca^{2+}) entre 0,85 e 2,16 mmol L^{-1} e proteína total (PT) entre 13,01% e 16,77%. Essa maior homogeneidade está relacionada à padronização das matérias-primas e ao controle rigoroso das etapas de processamento (Silva *et al.*, 2019), incluindo o uso de culturas específicas e o monitoramento das condições de acidificação (Dagostin; Carpine; Masson, 2013). Essas práticas favorecem a estabilidade da micela de caseína, proporcionando uma distribuição mais uniforme do cálcio e maior retenção de sólidos e minerais na matriz do queijo (Silva *et al.*, 2023).

Em contrapartida, os queijos artesanais apresentaram maior dispersão composicional, o que reflete a variabilidade do processo de produção e as características ambientais de cada região (Oliveira *et al.*, 2020). O pH variou entre 5,29 e 6,74, enquanto os teores de Ca^{2+} apresentaram a maior amplitude relativa, variando de 0,93 a 5,83 mmol L^{-1}. A proteína total (PT) variou entre 13,84% e 16,95%, enquanto a gordura total (GT) apresentou valores entre 12,75% e 19,75%, com valores de até 20,00% em algumas amostras, valor superior ao observado nos produtos industriais (Silva *et al.*, 2019). Essa variabilidade pode estar associada a diferenças na composição do leite, no manejo do rebanho, nas condições de processamento e na intensidade da fermentação (Sangaletti *et al.*, 2009).

Valores mais baixos de pH favorecem a solubilização do fosfato de cálcio coloidal e, consequentemente, o aumento na concentração de cálcio iônico na fase aquosa (Pereira et al., 2001), enquanto valores mais altos mantêm uma proporção maior de cálcio associada à micela de caseína (Dagostin; Carpine; Masson, 2013). Esse equilíbrio entre pH e cálcio interfere na

organização da rede proteica e pode favorecer a proteólise, contribuindo para a maior heterogeneidade observada nos queijos artesanais (Pastorino; Hansen; McMahon, 2003).

Figura 20 – Gráfico de barras dos parâmetros físicos dos queijos Minas Frescal: pH, Ca^{2+} (mmol L^{-1}), GT (% m m^{-1}), PT (% m m^{-1}) de queijos industriais (a) e queijos artesanais (b)



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

5.3.1.1 PCA dos Dados Físico-Químicos de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais

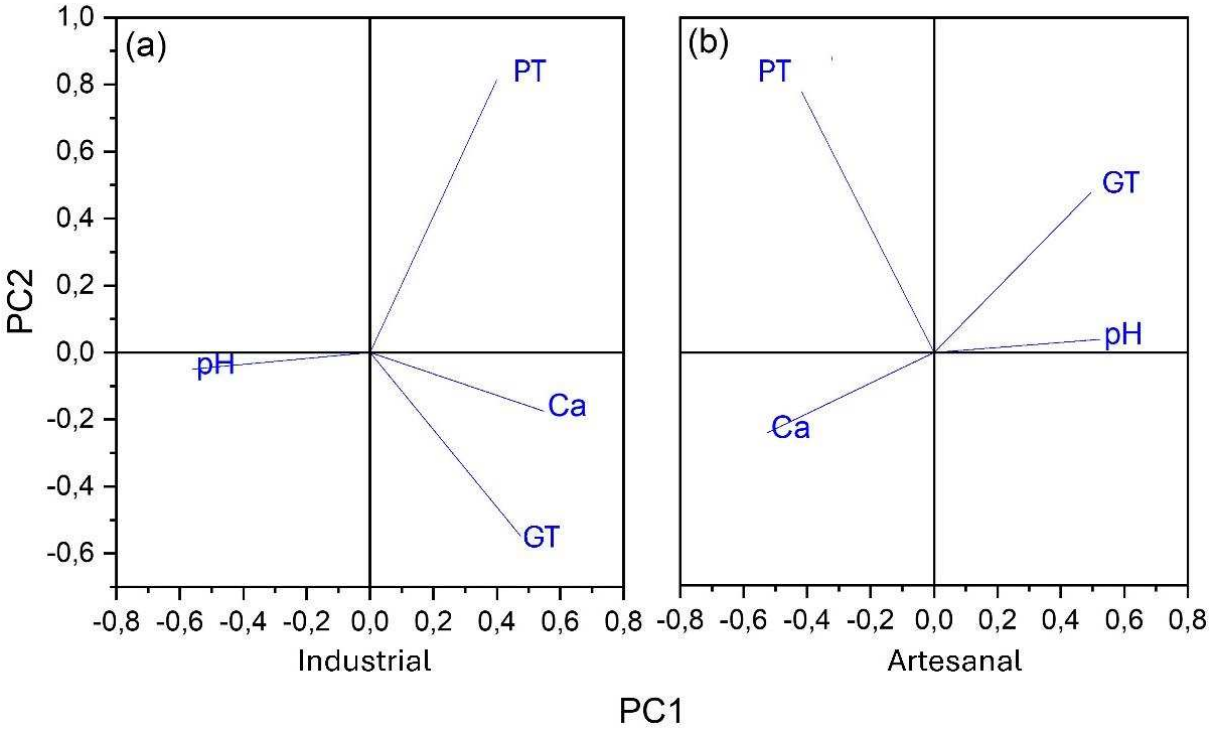
A PCA foi utilizada para avaliar as relações entre os parâmetros físico-químicos e destacar as diferenças entre os queijos Minas Frescal industriais e artesanais (Figura 18). Nos

queijos industriais, as variáveis cálcio iônico (Ca^{2+}), gordura total (GT) e proteína total (PT) apresentaram contribuições positivas para a PC1. Os vetores de Ca^{2+} e GT apresentaram orientações semelhantes, indicando associação positiva entre essas variáveis, enquanto o pH posicionou-se na direção oposta ao longo da PC1, sugerindo relação inversa com as demais variáveis (Figura 20A). A relação inversa observada entre pH e cálcio pode ser explicada pelas alterações promovidas pelo pH na micela de caseína. À medida que o pH diminui, parte do fosfato de cálcio coloidal é solubilizada, aumentando a concentração de cálcio iônico na fase aquosa (Dagostin, Carpine e Masson, 2013; Pereira et al., 2001). A redistribuição do cálcio modifica a organização da rede proteica e influencia a retenção de gordura e proteína na matriz do queijo (Silva *et al.*, 2023).

Nos queijos artesanais, observou-se um padrão semelhante quanto à relação inversa entre pH e cálcio, com os vetores posicionados em direções opostas no espaço definido pelas duas primeiras componentes principais (Figura 20B). Entretanto, diferentemente do observado nos queijos industriais, a gordura total apresentou orientação semelhante à do pH e oposta à do cálcio, indicando um comportamento distinto da fração lipídica em relação aos demais parâmetros físico-químicos. A proteína total manteve contribuição positiva para a PC2, embora com orientação distinta da gordura total.

Os resultados das PCAs indicam que a relação entre a fração lipídica e os demais parâmetros físico-químicos difere entre os sistemas industrial e artesanal**.** Nos queijos industriais, a gordura total apresentou associação positiva com o cálcio e a proteína, enquanto nos queijos artesanais orientou-se na mesma direção do pH e em sentido oposto ao cálcio e à proteína. Essas diferenças motivaram a investigação da fração lipídica por espectroscopia Raman, uma vez que essa técnica é sensível a alterações estruturais e amplamente utilizada na avaliação da autenticidade de produtos lácteos (Costa *et al.*, 2022; Genis *et al.*, 2021). A associação da espectroscopia Raman com ferramentas quimiométricas permite relacionar as diferenças observadas nos parâmetros físico-químicos com alterações em nível molecular, contribuindo para a caracterização e o monitoramento da qualidade do produto (Acharya, Nair e Abdul Salam, 2026; Zhang, Jiang e Xiong, 2023).

Figura 21 – PCA dos parâmetros físico-químicos pH, Ca^{2+}, GT, PT de queijos industriais (a) e de queijos artesanais (b)

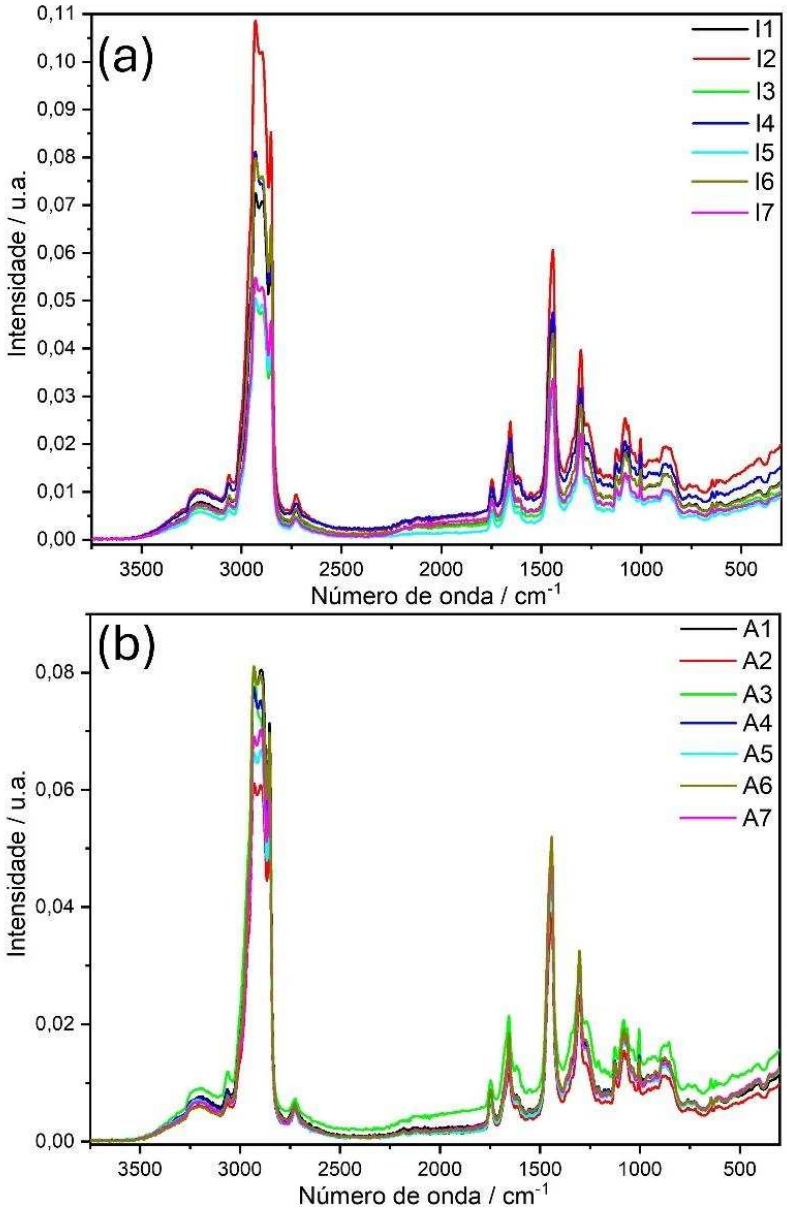


Fonte: Elaborada pela autora (2026).

5.3.2 Espectroscopia Raman de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais

Com base na análise físico-química, que indicou a fração lipídica como o principal fator de diferenciação entre as amostras, realizou-se a análise por espectroscopia Raman de queijos Minas Frescal industriais e artesanais (n = 14), com medições em triplicata. Os espectros Raman sem pré-processamento são apresentados na Figura 21:

Figura 22 – Espectros Raman brutos (λ_0 = 1064 nm) de queijos Minas industriais e artesanais, sem pré-processamento quimiométrico: (a) amostras industriais e (b) amostras artesanais



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Os espectros apresentados na Figura 21 exibem bandas associadas principalmente aos lipídios, às proteínas e à água (Acharya; Nair; Abdul Salam, 2026; Zhang; Jiang; Xiong, 2023). As principais atribuições vibracionais são apresentadas na Tabela 16. Entre as bandas da fração lipídica, destaca-se a banda em torno de 1746 cm^{-1}, atribuída ao estiramento C=O de ésteres de triacilgliceróis (Genis *et al.*, 2021; Zhang; Jiang; Xiong, 2023), além da região entre 2850 e 2930 cm^{-1}, relacionada aos estiramentos simétrico (ν_s) e assimétrico (ν_{as}) dos grupos CH_2 e CH_3 presentes nas cadeias alifáticas (Costa *et al.*, 2022; Digvijay *et al.*, 2025). A banda em

aproximadamente 1443 cm^{-1}, atribuída à deformação angular do tipo tesoura dos grupos metileno, é sensível às mudanças na organização da fração lipídica e sendo frequentemente utilizada para avaliar alterações estruturais em produtos lácteos (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021).

A fração proteica foi caracterizada principalmente pelas regiões das Amidas I, II e III, bandas utilizadas na avaliação estrutural de proteínas do leite (Digvijay *et al.*, 2025; Zhang; Jiang; Xiong, 2023). Além dessas regiões, o sinal em 1003 cm^{-1}, atribuído à vibração de respiração do anel aromático da fenilalanina, também é frequentemente empregado na caracterização da fração proteica (Li *et al.*, 2023; Zhang; Jiang; Xiong, 2023). O elevado teor de água do queijo Minas Frescal (Sangaletti *et al.*, 2009) também pode ser observada pelas bandas largas entre 3200 e 3400 cm^{-1}, atribuídas ao estiramento O-H das moléculas de água (Wu; Chen; Van der Meeren, 2024; Zhang; Jiang; Xiong, 2023). A presença dessas bandas é característica de queijos frescos e está diretamente relacionada ao elevado teor de água desse produto.

Em conjunto, as bandas observadas demonstram a complexidade da matriz do queijo, dificultando a diferenciação entre as amostras apenas pela inspeção visual dos espectros Raman (Genis *et al.*, 2021; Zhang; Jiang; Xiong, 2023). Por esse motivo, a interpretação dos espectros foi complementada pela PCA, permitindo identificar diferenças estruturais entre os queijos industriais e artesanais. Embora a espectroscopia Raman já tenha sido aplicada na caracterização de diferentes tipos de queijo, não foram encontrados estudos utilizando essa técnica para investigar a estrutura do queijo Minas Frescal. Dessa forma, a associação entre espectroscopia Raman e PCA representa uma abordagem promissora para a caracterização estrutural e o monitoramento da qualidade desse produto (Acharya; Nair; Abdul Salam, 2026; Costa *et al.*, 2022; Zhang; Jiang; Xiong, 2023).

Tabela 16 – Atribuições vibracionais sugeridas das bandas Raman observadas em matrizes de queijo Minas Frescal

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição Vibracional	Atribuição
3210	$\nu_{as}(OH)$	Água
2931	$\nu_{s}(CH_2)$	Lipídios (Ácidos graxos)
2894	$\nu_{s}(CH_3)$	Lipídios (Ácidos graxos)
2852	$\nu_{s}(CH_2)$	Lipídios (Ácidos graxos)

1746	ν(C=O) de ésteres	Lipídios (Triglicerídeos)
1650 – 1670	Amida I: ν(C=O)	Proteínas (Caseína)
1654	ν(C=C) (*cis*-insaturação)	Lipídios
1520 – 1580	Amida II: δ(N−H) + ν(C−N)	Proteínas
1443	δ(CH_2) e δ(CH_3) (*scissoring*)	Lipídios / Carboidratos
1302	δ(CH_2) ou t(CH_2) (*twisting/wagging*)	Lipídios
1200 – 1350	Amida III: δ(N−H) + ν(C−N)	Proteínas
1263	δ(=C−H) em grupos *cis*	Lipídios (Fosfolípideos)
1060 – 1090	ν(C−C) alifático ν(C−O)	Lipídios / Lactose
1003	ν(C−C) respiração do anel	Amino ácido (Fenilalanina)
830 – 875	δ(C−C−H) e δ(C−O−C)	Fosfolipídios / Lactose

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

5.3.2.1 PCA dos Espectros Raman de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais

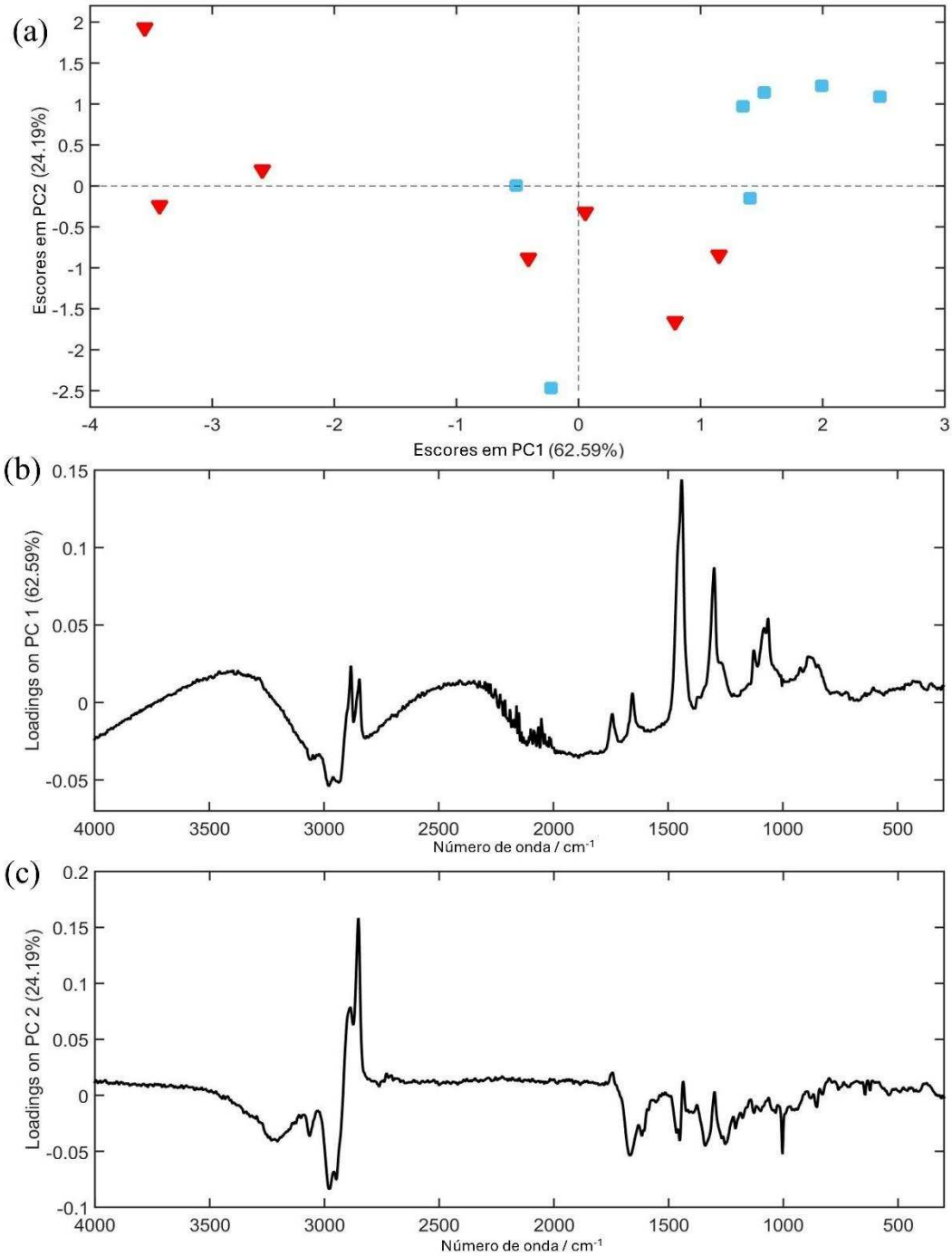
A PCA dos espectros Raman, realizada a partir dos espectros médios de cada amostra, permitiu diferenciar os queijos Minas Frescal industriais e artesanais. A PCA contendo todos os espectros individuais é apresentada no Apêndice (Figura A1). No gráfico de *scores* médios, Figura 23, a separação entre os queijos industriais (triângulos vermelhos, ▲) e artesanais (quadrados azuis, ■) ocorreu principalmente ao longo da PC1 (Figura 22A), responsável por 62,59% da variância total. As amostras industriais concentraram-se em valores negativos de PC1, enquanto as artesanais distribuíram-se principalmente em valores positivos dessa componente.

A análise dos *loadings* mostrou que a separação ao longo da PC1 (Figura 22B) foi determinada principalmente pela banda em 1443 cm^{-1}, atribuída à deformação angular (tesoura) dos grupos CH_2 e CH_3. Essa banda é sensível ao empacotamento e à organização das cadeias alifáticas, indicando que a separação observada está relacionada principalmente à organização da fase lipídica, e não apenas às diferenças no teor de gordura total (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021).

A PC2 apresentou contribuição importante da região entre 2850 e 2930 cm^{-1} (Figura 22C), associada aos estiramentos simétrico (ν_s) e assimétrico (ν_{as}) dos grupos CH_2 e CH_3 presentes nas cadeias alifáticas (Oliveira, 2026). Essas bandas estão relacionadas ao ambiente conformacional e à mobilidade das cadeias de ácidos graxos, o que complementa as

informações obtidas pela banda em 1443 cm^{-1} sobre a organização da fase lipídicas (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021).

Figura 23 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijos Minas industriais (triângulos vermelhos, ▲) vs. artesanais (quadrados azuis, ■), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Em conjunto, os resultados da PCA indicam que a separação entre os queijos Minas Frescal industriais e artesanais está associada às características dos sistemas de produção. Nos queijos industriais, a maior padronização da matéria-prima e das etapas de processamento, incluindo o teor de gordura do leite, pode contribuir para a menor variabilidade observada. Em contrapartida, nos queijos artesanais, a maior variabilidade da matéria-prima e das condições de produção pode influenciar a composição do leite e, consequentemente, a organização da fração lipídica (Costa *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019).

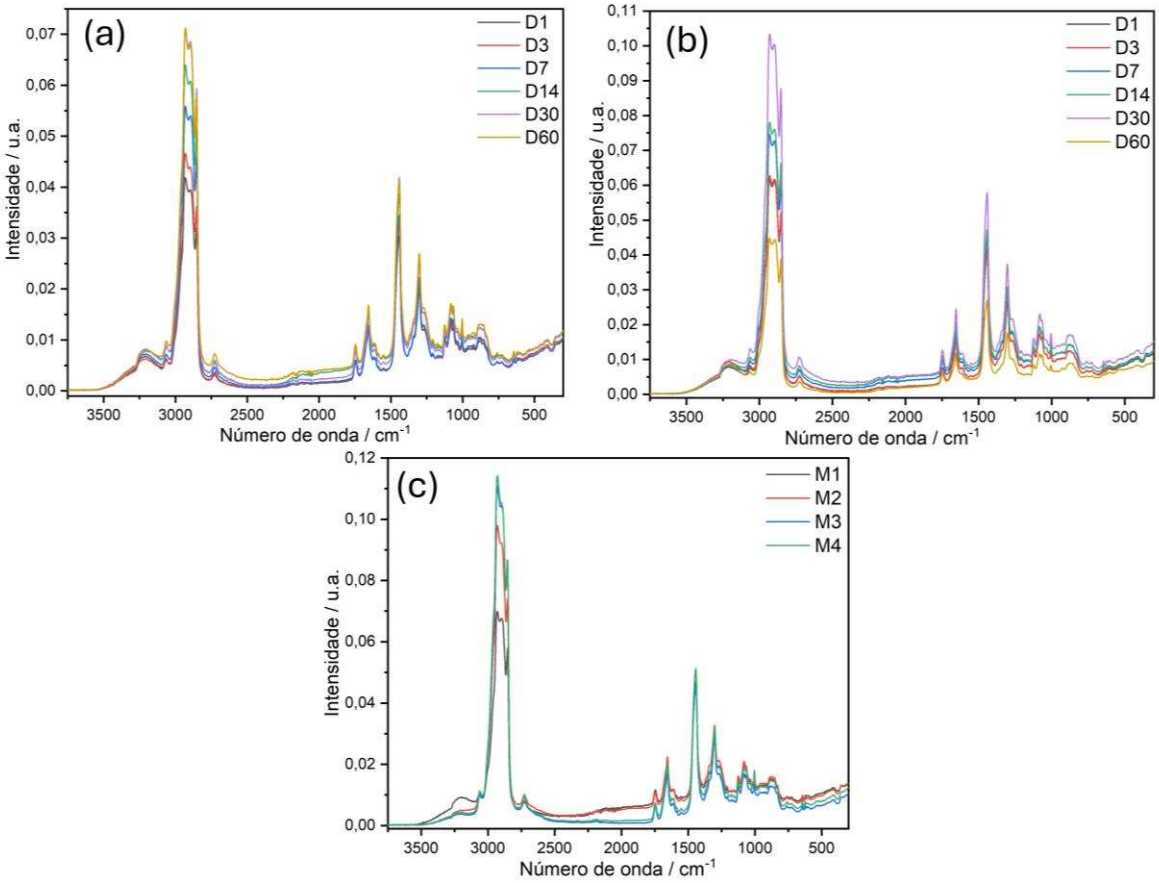
Esses resultados fornecem uma base para compreender as alterações estruturais observadas durante o armazenamento, discutidas nas seções seguintes.

5.3.3 Espectroscopia Raman Durante a Degradação de Queijos Minas Frescal

Embora a espectroscopia Raman tenha sido aplicada na caracterização de diferentes tipos de queijo, estudos voltados ao monitoramento temporal da degradação do queijo Minas Frescal ainda são escassos, especialmente quando comparados os sistemas industrial e artesanal. A degradação do queijo Minas Frescal, bem como os fatores associados à sua deterioração, foi investigada por espectroscopia Raman em amostras industriais e artesanais armazenadas sob refrigeração ao longo de 1, 3, 7, 14, 30 e 60 dias, Figura 23. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados da PCA discutidos nesta seção foram obtidos utilizando o espectro médio de cada amostra, enquanto as análises incluindo todos os espectros individuais são fornecidas nas Figuras A2 e A3 do Apêndice.

São apresentados na Figura 22 os espectros Raman brutos obtidos durante a degradação do queijo Minas Frescal, com medições realizadas em triplicata. As Figuras 23(a) e 23(b) apresentam os espectros das amostras industrial e artesanal, respectivamente, durante o armazenamento refrigerado nos dias 1, 3, 7, 14, 30 e 60. A Figura 23(c) apresenta os espectros obtidos durante o armazenamento em temperatura ambiente, avaliados após 1, 2, 3 e 4 meses.

Figura 24 – Espectros Raman brutos (λ_0 = 1064 nm), sem pré-processamento quimiométrico, de queijos Minas Frescal durante o armazenamento: (a) queijo industrial e (b) queijo artesanal sob refrigeração, nos dias 1, 3, 7, 30 e 60; e (c) queijo industrial armazenado



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Os espectros Raman apresentados na Figura 23 exibem as mesmas atribuições vibracionais descritas anteriormente e atribuídas aos principais constituintes do queijo Minas Frescal (Tabela 16). Esses espectros constituíram a base para as análises por PCA apresentadas nas seções seguintes, nas quais foram investigadas as diferenças entre os queijos industriais e artesanais e as alterações estruturais associadas ao armazenamento.

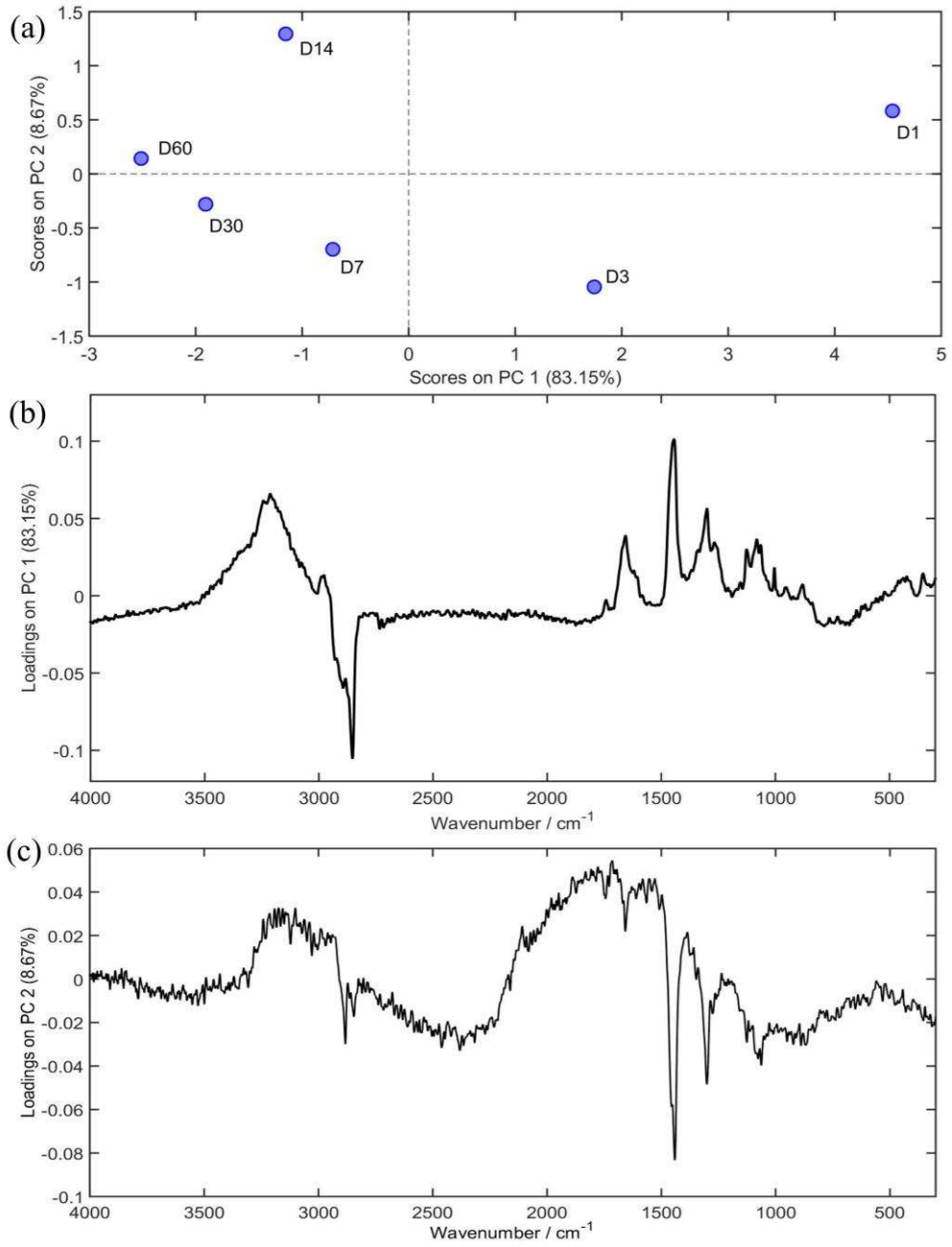
5.3.3.1 PCA da Degradação de Queijos Minas Frescal Industriais sob Refrigeração

A degradação dos queijos Minas Frescal industriais ao longo do armazenamento foi avaliada por meio das trajetórias temporais observadas nos gráficos de PCA, utilizando os espectros médios de cada amostra. A PCA obtida a partir dos espectros médios é apresentada na Figura 23, enquanto a análise incluindo todos os espectros individuais é apresentada no Apêndice (Figura A2). A PC1 explicou 83,15% da variância total, enquanto a PC2 foi responsável por 8,67% (Figura 24A). A alta variância explicada pela PC1 indica que as principais mudanças estruturais ocorridas durante o armazenamento estão concentradas nesse componente. A análise dos *loadings* mostrou que a PC1 foi determinada principalmente pela banda em 1443 cm^{-1} e na região de 2850-2930 cm^{-1} (Figura 24B), que apresentaram contribuições de sinais opostos. A banda em 1443 cm^{-1} é atribuída à deformação angular (tesoura) dos grupos CH_2, enquanto a região de 2850–2930 cm^{-1} corresponde aos estiramentos simétrico e assimétrico de CH_2/CH_3 das cadeias alifáticas. Em conjunto, essas bandas estão associadas à organização e ao ambiente conformacional da fase lipídica, indicando que as principais alterações observadas durante o armazenamento envolveram essa fração (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021).

Nos estágios iniciais (1 e 3 dias), os scores posicionaram-se na região positiva da PC1, indicando que a organização da fase lipídica permanecia próxima à observada no início do armazenamento. A partir do 7º dia, observou-se um deslocamento mais pronunciado ao longo dessa componente, sugerindo o início de modificações estruturais na fase lipídica. Nos estágios intermediários e finais (14, 30 e 60 dias), a progressão contínua dos scores em direção à região negativa da PC1 indica alterações progressivas na organização e no ambiente conformacional das cadeias lipídicas. Essas mudanças são compatíveis com processos de degradação lipídica descritos durante o armazenamento de queijos, nos quais a hidrólise dos triacilgliceróis pode modificar o ambiente químico e a organização das cadeias alifáticas da fração lipídica (Genis *et al.*, 2021; Tarakci; Kucukoner, 2006).

A PC2 apresentou como principal contribuição a banda em 1443 cm^{-1} (Figura 24C), também associada à deformação angular dos grupos CH_2. Embora tenha explicado uma parcela menor da variância total, essa componente evidencia variações secundárias relacionadas à organização da fase lipídica, complementando as informações fornecidas pela PC1. Em conjunto, esses resultados indicam uma reorganização progressiva da fase lipídica durante o armazenamento, compatível com alterações estruturais decorrentes da degradação do queijo.

Figura 25 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijo Minas industrial durante a degradação sob refrigeração (dias 1, 3, 7, 14, 30 e 60), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

5.3.3.2 PCA da Degradação de Queijos Minas Frescal Artesanais sob Refrigeração

Nos queijos artesanais, os resultados da PCA apresentados na Figura 25 também foram obtidos a partir dos espectros médios de cada amostra. A PCA individual é apresentada na Figura A3, no apêndice. A PC1 explicou 70,14% da variância total, enquanto a PC2 foi responsável por 25,39% (Figura 25A). Diferentemente dos queijos industriais, nos quais a principal fonte de variação esteve associada à banda em 1443 cm^{-1}, a PC1 dos queijos artesanais foi influenciada pela região de estiramento O-H (3200 - 3400 cm^{-1}), indicando que variações no teor de água da matriz contribuíram de forma importante para a diferenciação das amostras (Figura 25B) (Wu *et al.*, 2023; Zhang, Jiang e Xiong, 2023). A PC2 apresentou contribuição da banda em 1443 cm^{-1}, atribuída à deformação angular (tesoura) dos grupos CH_2 e CH_3, indicando modificações na organização da fase lipídica (Figura 25C) (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021).

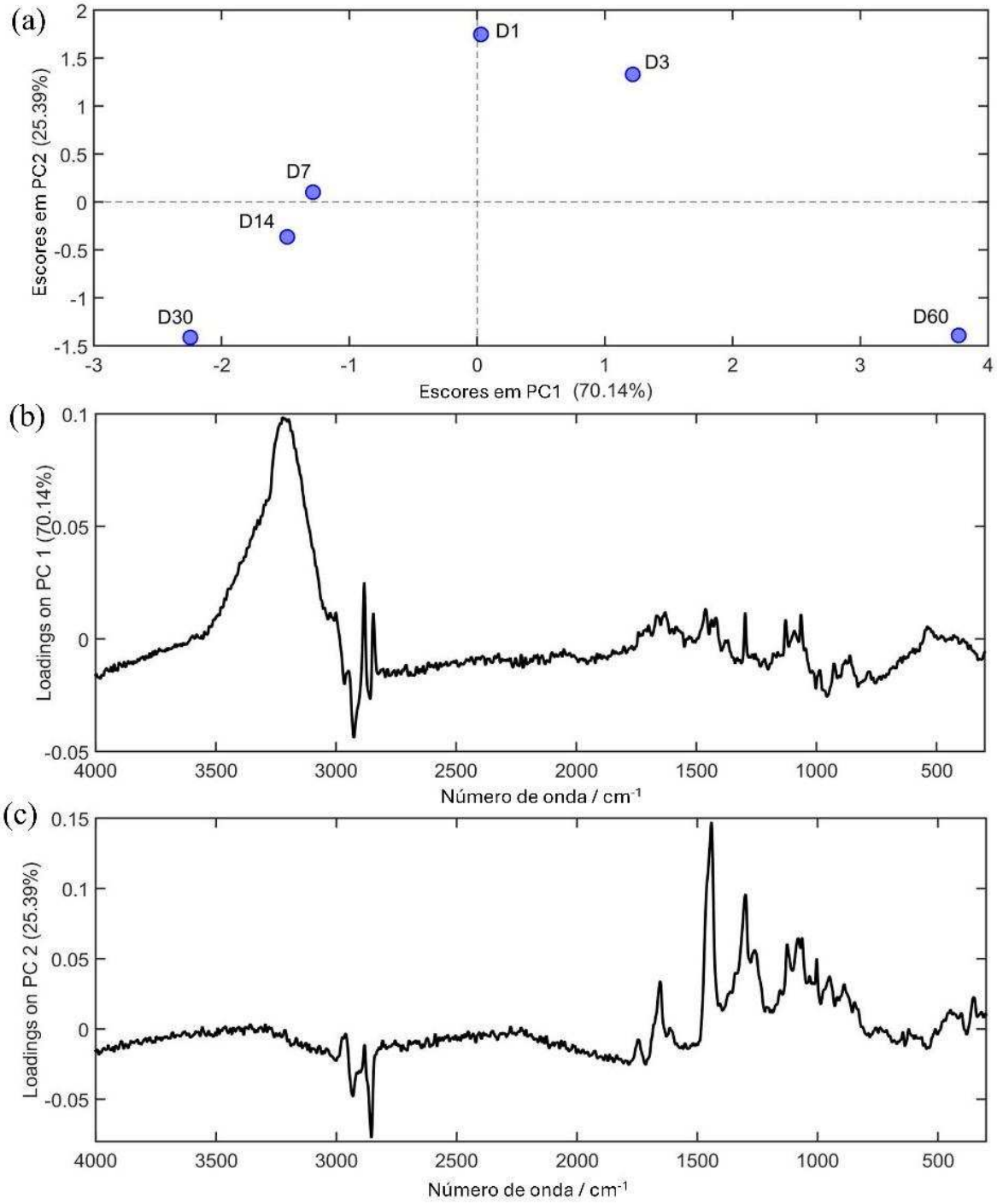
Do ponto de vista temporal, nos estágios iniciais (1 e 3 dias), os *scores* apresentaram pequenas variações ao longo de ambas as componentes principais, indicando que poucas alterações estruturais ocorreram no início do armazenamento. A partir do 7º dia, observou-se um deslocamento simultâneo ao longo da PC1 e da PC2, sugerindo que o processo de degradação passou a envolver tanto a perda de água (sinérese) quanto modificações na organização da fase lipídica. No estágio intermediário (14 dias), essa tendência tornou-se mais evidente, com maior dispersão ao longo da PC2, indicando alterações progressivas na organização da fase lipídica. Nos estágios finais (30 e 60 dias), os deslocamentos mais pronunciados ao longo dessa componente foram compatíveis com modificações estruturais mais intensas, caracterizadas por alterações no empacotamento das cadeias lipídicas e, consequentemente, na cristalinidade da gordura, definida como o grau de organização dessas cadeias (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021).

De modo geral, a evolução temporal das amostras é compatível com alterações na fase lipídica descritas durante o armazenamento de queijos (Sangaletti *et al.*, 2009; Tarakci; Kucukoner, 2006). Durante esse processo, a hidrólise de triacilgliceróis pode modificar a organização da fase lipídica, contribuindo para as alterações observadas nas bandas em 1443 cm^{-1} e na região de 2850–2930 cm^{-1} (Digvijay *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021). Nos queijos artesanais, essas modificações podem ser mais pronunciadas em razão da maior variabilidade da matéria-prima e das condições de produção, contribuindo para uma maior instabilidade estrutural durante o armazenamento (Costa *et al.*, 2022; Dagostin; Carpine; Masson, 2013).

Embora a refrigeração reduza a velocidade dos processos de degradação, modificações na organização da fase lipídica continuam ocorrendo ao longo do armazenamento. Essas

alterações afetam a cristalinidade da gordura, definida como o grau de organização e empacotamento das cadeias lipídicas (Cui *et al.*, 2025; Digvijay *et al.*, 2025), bem como a mobilidade molecular dessas cadeias. Como consequência, as bandas associadas ao estiramento e à deformação C-H apresentam modificações estruturais relacionadas à perda de frescor durante o armazenamento (Genis *et al.*, 2021).

Figura 26 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijo Minas artesanal durante a degradação sob refrigeração (dias 1, 3, 7, 14, 30 e 60), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Em conjunto, os resultados mostram que a degradação sob refrigeração ocorreu de maneira distinta nos dois sistemas de produção. Nos queijos industriais, as principais alterações

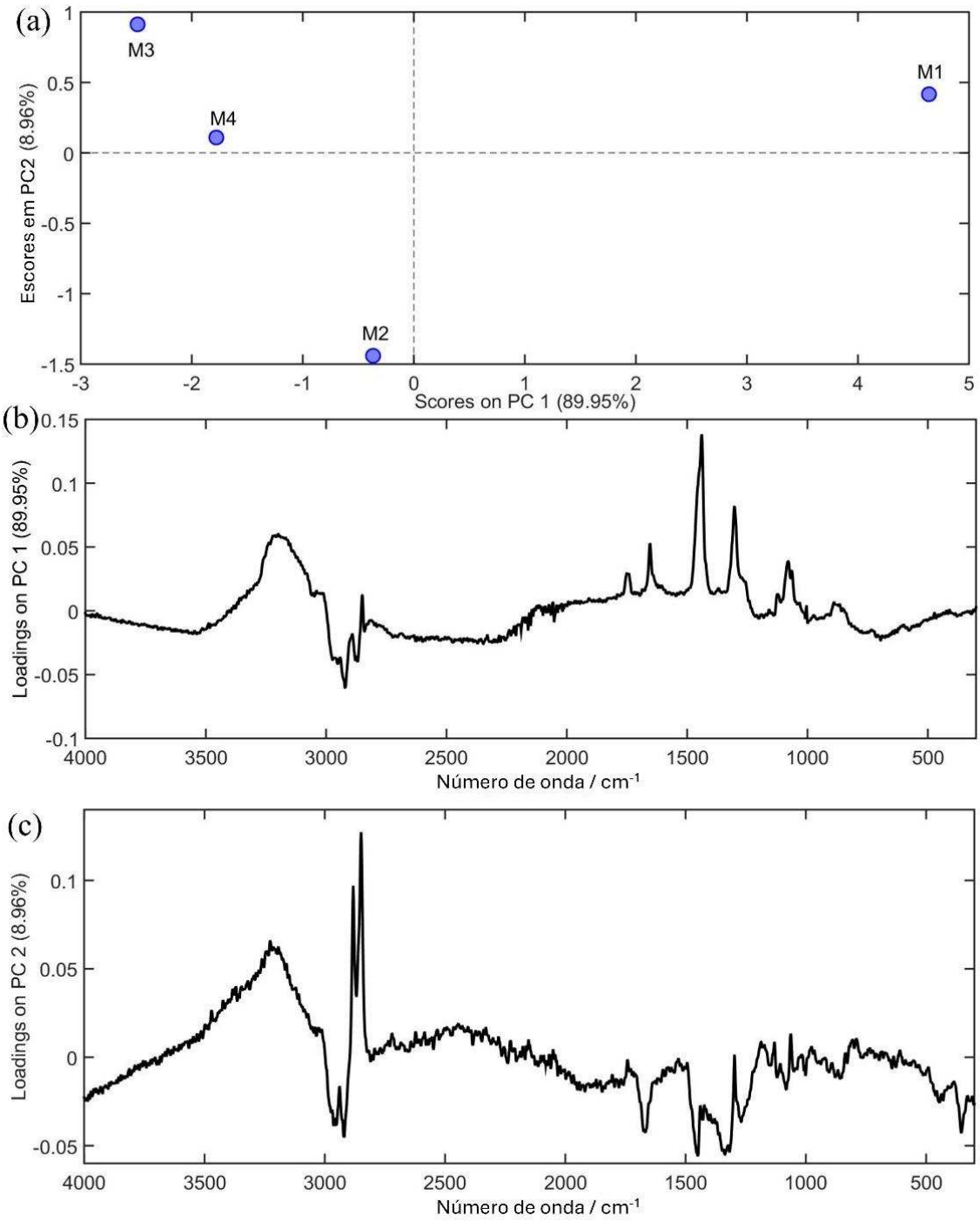
estiveram relacionadas à reorganização da fase lipídica, enquanto nos queijos artesanais a perda de água e as modificações na organização da fase lipídica contribuíram simultaneamente para a diferenciação das amostras ao longo do armazenamento. Esses resultados demonstram que a espectroscopia Raman associada à PCA é capaz de acompanhar as mudanças estruturais durante o armazenamento refrigerado e distinguir os diferentes padrões de degradação dos queijos Minas Frescal industriais e artesanais.

5.3.3.3 PCA da Degradação de Queijos Minas Frescal Industriais em Temperatura Ambiente

A Figura 26 apresenta a PCA dos espectros Raman médios obtidos durante o experimento de degradação de uma amostra de queijo Minas Frescal industrial armazenada em temperatura ambiente. A PCA incluindo todos os espectros individuais é apresentada na Figura A4.

A separação das amostras ao longo dos quatro meses de armazenamento (Figura 26A) indica mudanças estruturais progressivas na matriz do queijo durante o armazenamento em temperatura ambiente. Essas alterações podem ser atribuídas à perda de água (sinérese) e a modificações na organização da fase lipídica. As principais variações espectrais foram observadas na banda em aproximadamente 1443 cm^{-1} (Figura 26B) e na região entre 2800 e 3000 cm^{-1} (Figura 26C), associadas às vibrações de deformação e estiramento dos grupos CH_2 e CH_3. Conforme discutido anteriormente, essas bandas são sensíveis a alterações na organização da fase lipídica e indicam modificações progressivas nas cadeias de ácidos graxos durante o armazenamento (Cui *et al.*, 2025; Genis *et al.*, 2021). Em conjunto, os resultados mostram que a degradação da fase lipídica foi mais intensa em temperatura ambiente do que sob refrigeração, em concordância com a maior velocidade de deterioração descrita para o queijo Minas Frescal nessas condições (Sangaletti *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2019).

Figura 27 – (a) Gráfico de escores da PCA dos espectros Raman médios de queijo Minas industrial durante a degradação à temperatura ambiente (meses M1, M2, M3 e M4), (b) *loadings* da PC1 e (c) *loadings* da PC2



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Comparando os dois sistemas de armazenamento, observa-se que a refrigeração retardou as alterações estruturais da fase lipídica, enquanto o armazenamento em temperatura ambiente acelerou essas modificações. Esses resultados reforçam o potencial da espectroscopia Raman

associada à PCA para acompanhar a degradação estrutural de queijos Minas Frescal sob diferentes condições de armazenamento.

5.3.4 Caracterização Físico-Química da Degradação de Queijos Minas Frescal Industriais e Artesanais

As análises de pH, cálcio iônico e gordura total foram realizadas nos dias 1 e 60 de armazenamento refrigerado, com o objetivo de relacionar os resultados físico-químicos às alterações estruturais observadas por espectroscopia Raman (Tabela 17).

Tabela 17 – Parâmetros físico-químicos de queijos Minas Frescal industriais e artesanais nos dias 1 e 60 de armazenamento refrigerado

Variável	Industrial		Artesanal	
	Dia 1	Dia 60	Dia 1	Dia 60
pH	6.74	6.19	6.74	5.3
Ca (mmol L^{-1})	1.52	3	1.18	7
GT (%)	17.5	19	19.25	18

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

O pH diminuiu ao longo do armazenamento em ambos os sistemas de produção, sendo a acidificação mais intensa nos queijos artesanais. Esse comportamento pode estar relacionado à maior variabilidade do processo produtivo, às diferenças na matéria-prima e aos processos bioquímicos (Dagostin; Carpine; Masson, 2013; Sangaletti *et al.*, 2009).

A redução do pH favorece a solubilização do cálcio da fase coloidal para a fase de soro, alterando o balanço mineral e a estabilidade da matriz proteica (Feeney; Guinee; Fox, 2002). Em ambos os tipos de queijo, observou-se aumento na concentração de cálcio iônico ao final do armazenamento, comportamento esperado em condições de maior acidez, nas quais a solubilização do fosfato de cálcio coloidal das micelas de caseína é intensificada (Dagostin; Carpine; Masson, 2013). Além da acidificação, esse aumento pode estar relacionado às alterações na umidade e à sinérese ocorridas durante o armazenamento, que favorecem a concentração de minerais na fase aquosa residual (Silva *et al.*,2023). Essas alterações também

podem modificar a organização da matriz de caseína, influenciando sua capacidade de retenção de água e gordura.

Em relação ao teor de gordura determinado por butirômetro, observou-se um aumento aparente no queijo industrial e uma redução no artesanal. Como essa determinação é expressa em base úmida e depende da separação da fase lipídica, essas variações podem estar relacionadas às mudanças na retenção de água e à intensidade da sinérese durante o armazenamento (Dagostin; Carpine; Masson, 2013; Silva *et al.*, 2023). Alterações na acidez também podem modificar a organização da rede de caseína, influenciando a retenção ou a perda de gordura juntamente com o soro (Feeney; Guinee; Fox, 2002). Assim, as diferenças observadas provavelmente estão relacionadas às modificações na distribuição da água, à sinérese e às alterações estruturais da matriz durante o armazenamento, que podem influenciar a determinação da gordura em base úmida, mais do que a mudanças efetivas no teor total de lipídios do produto.

Os queijos artesanais apresentaram maiores alterações físico-químicas ao longo do armazenamento, caracterizada por maior acidificação e maior solubilização do cálcio. Essas alterações acompanharam as modificações estruturais observadas por espectroscopia Raman, indicando que mudanças no balanço mineral ocorreram em paralelo à reorganização da fase lipídica durante o armazenamento. Em contrapartida, os queijos industriais apresentaram menor variação nos parâmetros físico-químicos, comportamento compatível com a maior estabilidade estrutural observada por Raman e com a maior padronização do processo produtivo.

5.4 SÍNTESE DOS RESULTADOS

A espectroscopia Raman associada à PCA permitiu diferenciar os queijos Minas Frescal industriais e artesanais e acompanhar as alterações estruturais ocorridas durante o armazenamento. De modo geral, os queijos artesanais apresentaram maior variabilidade espectral e maior instabilidade físico-química ao longo do tempo, enquanto os industriais exibiram comportamento mais homogêneo e maior estabilidade sob refrigeração.

As principais alterações observadas durante o armazenamento estiveram relacionadas à organização da fase lipídica e à distribuição de água na matriz do queijo. As mudanças nas bandas em aproximadamente 1443 cm^{-1} e na região entre 2800 e 3000 cm^{-1}, associadas aos grupos CH_2 e CH_3, indicaram modificações na organização da fase lipídica. Nos queijos artesanais, a região de estiramento O-H também apresentou contribuição importante, indicando

que a perda de água decorrente da sinérese exerceu influência significativa durante o armazenamento. Em conjunto, esses resultados sugerem que a degradação envolve alterações estruturais na fase lipídica acompanhadas por mudanças na distribuição de água da matriz. Essas modificações ocorreram em paralelo à redução do pH, ao aumento da concentração de cálcio iônico e às alterações físico-químicas observadas ao longo do armazenamento, sendo mais pronunciadas nos queijos artesanais.

A amostra armazenada em temperatura ambiente apresentou alterações estruturais mais intensas do que aquelas observadas sob refrigeração, corroborando a influência da temperatura sobre a velocidade das modificações estruturais da fase lipídica. Os resultados físico-químicos e espectroscópicos apresentaram comportamento consistente, indicando que a degradação do produto pode ser acompanhada tanto pelas alterações estruturais observadas por espectroscopia Raman quanto pelas mudanças nos parâmetros físico-químicos.

Até onde foi possível verificar na literatura, este é o primeiro estudo que aplica a espectroscopia Raman à caracterização estrutural de queijos Minas Frescal, incluindo a diferenciação entre produtos industriais e artesanais e o acompanhamento das alterações estruturais durante o armazenamento. Os resultados obtidos demonstram que a espectroscopia Raman associada à quimiometria constitui uma ferramenta rápida e não destrutiva para a caracterização e o monitoramento da qualidade desse produto, evidenciando seu potencial para aplicações em controle de qualidade, autenticação e monitoramento da estabilidade de queijos frescos. Como perspectiva, a inclusão de um número maior de amostras e a aplicação de métodos quimiométricos supervisionados, como PLS-DA, poderão contribuir para o desenvolvimento de modelos mais robustos de classificação e predição, ampliando o potencial da espectroscopia Raman para aplicações em controle de qualidade e autenticação de queijos Minas Frescal.

6 CONCLUSÕES

Esta tese agregou três estudos voltados à ciência e tecnologia de produtos lácteos, abordando desde a estabilidade do leite submetido ao processamento UHT até a caracterização estrutural da gordura do leite e de queijos Minas Frescal. Cada capítulo se desenvolveu a partir de matrizes específicas, dentro dos produtos lácteos, e assim foi possível compreender como a composição e as alterações estruturais influenciam as propriedades desses produtos, além de como diversas ferramentas podem auxiliar nessa análise.

No primeiro estudo, o uso do planejamento de misturas permitiu investigar o efeito combinado do sal citrato de sódio e diferentes sais de fosfatos na estabilidade coloidal do leite. Os resultados demonstraram que a combinação desses sais gera efeito superior ao seu uso isolado, chegando em uma formulação que melhora a estabilidade térmica do leite para processamento térmico. Foi validado o modelo matemático proposto, e assim ampliando a compreensão sobre a relação entre sais quelantes, equilíbrio de cálcio e a estabilidade do sistema.

Nos estudos seguintes, a espectroscopia vibracional foi utilizada como ferramenta para investigar diferentes matrizes lácteas. As espectroscopias Raman e infravermelha, quando utilizadas para caracterizar as gorduras de leite de vaca, cabra, ovelha e búfala, foram capazes de identificar variações que se relacionam à composição lipídica das diferentes espécies analisadas. A junção desses métodos com a PCA evidenciou que os espectros possuem informações suficientes para classificar as amostras de acordo com sua origem, o que atesta o potencial dessas abordagens para autenticação e controle de qualidade.

A mesma abordagem foi empregada no estudo dos queijos Minas Frescal, no qual a espectroscopia Raman permitiu diferenciar produtos artesanais e industriais e acompanhar as modificações estruturais ocorridas durante o armazenamento. A alteração na matriz lipídica e na distribuição de água em conjunto com as mudanças físico-químicas ao longo do tempo, mostraram que a técnica pode ser usada para um monitoramento rápido e não destrutivo da qualidade e deterioração desses produtos.

Os três estudos desenvolvidos nesta tese evidenciam que abordagens distintas podem fornecer informações complementares sobre produtos lácteos. Enquanto o planejamento de misturas possibilitou compreender e otimizar o efeito dos sais quelantes na estabilidade do leite destinado ao processamento UHT, a espectroscopia vibracional, associada à quimiometria, permitiu investigar diferenças estruturais entre gorduras de leite de diferentes espécies e acompanhar as modificações que ocorrem em queijos Minas Frescal durante o armazenamento.

Em conjunto, esses resultados ampliam a compreensão sobre diferentes matrizes lácteas e demonstram a contribuição dessas metodologias para estudos voltados à caracterização, ao desenvolvimento de produtos e ao controle de qualidade.

Os resultados obtidos podem ser utilizados para a continuidade desta linha de pesquisa. A utilização de um número maior de amostras, que contemple diferentes origens e condições de processamento, pode permitir a construção de modelos quimiométricos mais robustos. Além disso, a aplicação de métodos supervisionados, pode ampliar a capacidade de classificação e predição das técnicas espectroscópicas, para sua utilização em estudos de autenticação e em aplicações voltadas ao controle de qualidade de leite e derivados.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, B. S.; NAIR, S.; ABDUL SALAM, A. A. Quality Analysis and Detection of Adulterants and Contaminations in Milk/Milk Powder by Raman Spectroscopy. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [*s. l.*], vol. 25, nº 1, p. e70403, 2026. Disponível em: https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.70403.

ADRIANO, L. H. *et al.* Tutorial para Aplicação Didática de Planejamentos de Misturas Utilizando LibreOffice e RStudio. **Química Nova**, [*s. l.*], 2024.

AGIOMAVRITI, A.-A. *et al.* Spectroscopy-Based Methods and Supervised Machine Learning Applications for Milk Chemical Analysis in Dairy Ruminants. **Chemosensors**, [*s. l.*], vol. 12, nº 12, p. 263, 2024.

AHMADI, E.; HUPPERTZ, T.; VASILJEVIC, T. Heat stability of skim milk containing various levels of micellar calcium phosphate. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 153, p. 105900, 2024.

AKHGAR, C. K. *et al.* Fatty Acid Prediction in Bovine Milk by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy after Solvent-Free Lipid Separation. **Foods**, [*s. l.*], vol. 10, nº 5, p. 1054, 2021.

ALEGBELEYE, O. O. *et al.* Hazards of a 'healthy' trend? An appraisal of the risks of raw milk consumption and the potential of novel treatment technologies to serve as alternatives to pasteurization. **Trends in Food Science & Technology**, [*s. l.*], vol. 82, p. 148–166, 2018.

ALI, A. H. *et al.* Profiling of phospholipids molecular species from different mammalian milk powders by using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, [*s. l.*], vol. 62, p. 143–154, 2017.

ALMEIDA, M. R. de *et al.* Application of FT-Raman Spectroscopy and Chemometric Analysis for Determination of Adulteration in Milk Powder. **Analytical Letters**, [*s. l.*], vol. 45, nº 17, p. 2589–2602, 2012.

ALMEIDA, M. R. *et al.* Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. **Journal of Raman Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 42, nº 7, p. 1548–1552, 2011.

AMORES, G.; VIRTO, M. Total and Free Fatty Acids Analysis in Milk and Dairy Fat. **Separations**, [*s. l.*], vol. 6, nº 1, p. 14, 2019.

AZCARATE, S. M.; PINTO, L.; GOICOECHEA, H. C. Applications of mixture experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. **Journal of Chemometrics**, [*s. l.*], vol. 34, nº 12, 2020.

BADRI, A.; BINET, C.; LAVALLEY, J.-C. Use of methanol as an IR molecular probe to study the surface of polycrystalline ceria. **Journal of the Chemical Society, Faraday**

Transactions, [*s. l.*], vol. 93, nº 6, p. 1159–1168, 1997. Disponível em: https://pubs.rsc.org/ft/article/93/6/1159-1168/171671.

BANDYOPADHYAY, K.; VERMA, A.; SAHA, S. Good fat vs bad fat in Milk: A molecular level Understanding of Indian cow milk using confocal Raman microscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 330, p. 125705, 2025.

BEĆ, K. B. *et al.* Principles and Applications of Vibrational Spectroscopic Imaging in Plant Science: A Review. **Frontiers in Plant Science**, [*s. l.*], vol. 11, 2020.

BERTSCH, P.; SAVORANI, L.; FISCHER, P. Rheology of Swiss Cheese Fondue. **ACS Omega**, [*s. l.*], vol. 4, nº 1, p. 1103–1109, 2019.

BEZERRA, M. A. *et al.* Application of mixture design in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, [*s. l.*], vol. 152, p. 104336, 2020.

BOUMPA, T. *et al.* Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goats' milk. **Journal of Dairy Research**, [*s. l.*], vol. 75, nº 2, p. 160–166, 2008.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Diário Oficial da União**: Brasil, 9013, 30 mar. 2017.

BRAUN, K.; HANEWALD, A.; VILGIS, T. A. Milk Emulsions: Structure and Stability. **Foods**, [*s. l.*], vol. 8, nº 10, p. 483, 2019.

BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. [*S. l.*]: Wiley, 2007.

BUENO, T. M. *et al.* Desnaturação proteica: importâncias na indústria de laticínios. **Research, Society and Development**, [*s. l.*], vol. 9, nº 11, p. e2679119860, 2020.

BURUK SAHIN, Y.; AKTAR DEMIRTAŞ, E.; BURNAK, N. Mixture design: A review of recent applications in the food industry. **Pamukkale University Journal of Engineering Sciences**, [*s. l.*], vol. 22, nº 4, p. 297–304, 2016.

BYUN, Y.; HWANG, S.; LEE, J. Characterization of physicochemical properties of casein mixture preparation extracted from organic milk for use as an emulsifier in organic processed foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*s. l.*], vol. 99, nº 5, p. 2375–2383, 2019.

CAMPOS, N. da S. *et al.* Influence of different calcium-chelating salts on the colloidal structure of skimmed milk under simulated heat treatment conditions. **International Journal of Dairy Technology**, [*s. l.*], vol. 78, nº 1, 2025. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0307.13149.

CASAS, J. M. *et al.* 31P NMR spectroscopic studies of the influence of the environment in the degradation process of the Graham's salt. **Ceramics International**, [*s. l.*], vol. 36, nº 1, p. 39–46, 2010.

CENITI, C. *et al.* Recent Advances in the Determination of Milk Adulterants and Contaminants by Mid-Infrared Spectroscopy. **Foods**, [*s. l.*], vol. 12, nº 15, p. 2917, 2023.

CHANDRA, A. *et al.* Unveiling the Molecular Secrets: A Comprehensive Review of Raman Spectroscopy in Biological Research. **ACS Omega**, [*s. l.*], vol. 9, nº 51, p. 50049–50063, 2024.

CHEUNG, P. C. K. **Handbook of Food Chemistry**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.

CORNELL, J. A. **Experiments with Mixtures**. [*S. l.*]: Wiley, 2002.

COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C. de; MAY, G. M. O modelamento estatístico de misturas: experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Química Nova**, [*s. l.*], vol. 28, nº 6, p. 1116–1122, 2005.

COSTA, J. R. *et al.* The taste of a champion: Characterization of artisanal cheeses from the Minas Gerais region (Brazil) by Raman spectroscopy and microstructural analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, [*s. l.*], vol. 112, p. 104704, 2022.

CROTTA, M. *et al.* Consumers' behavior in quantitative microbial risk assessment for pathogens in raw milk: Incorporation of the likelihood of consumption as a function of storage time and temperature. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], vol. 99, nº 2, p. 1029–1038, 2016.

CRUZ, A. G. da *et al.* **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

CUI, G. *et al.* **Exploring the role of milk fat structure and crystallization in enhancing whipped cream properties and stability**. [*S. l.*]: Academic Press, 2025.

CZAMARA, K. *et al.* Raman spectroscopy of lipids: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 46, nº 1, p. 4–20, 2015.

DAGOSTIN, J. L. A.; CARPINE, D.; MASSON, M. L. Influence of Acidification Method on Composition, Texture, Psychrotrophs, and Lactic Acid Bacteria in Minas Frescal Cheese. **Food and Bioprocess Technology**, [*s. l.*], vol. 6, nº 11, p. 3017–3028, 2013.

DIAS, B. F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescalartesanal e industrial. **REVISTA DE AGRICULTURA NEOTROPICAL**, [*s. l.*], vol. 3, nº 3, p. 57–64, 2016.

DIGVIJAY, D. *et al.* Understanding freezing-induced changes in the protein and fat phases of aged Gouda cheese using Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. **Food Research International**, [*s. l.*], vol. 214, 2025.

EMIN, A.; HUSHUR, A.; MAMTIMIN, T. Raman study of mixed solutions of methanol and ethanol. **AIP Advances**, [*s. l.*], vol. 10, nº 6, 2020.

FEENEY, E. P.; GUINEE, T. P.; FOX, P. F. Effect of pH and Calcium Concentration on Proteolysis in Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], vol. 85, nº 7, p. 1646–1654, 2002.

FEITOSA, S. B. *et al.* Caracterização microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado em feiras livres. **Saúde & Ciência em Ação**, [*s. l.*], vol. 3, nº 1, 2016. Disponível em: https://www.revistas.unifan.edu.br/index.php/RevistaICS/article/view/227. Acesso em: 15 jul. 2026.

FENG, Z. *et al.* Raman spectroscopy and fusion machine learning algorithm: A novel approach to identify dairy fraud. **Journal of Food Composition and Analysis**, [*s. l.*], vol. 129, p. 106090, 2024.

FERREIRA, M. Quimiometria III - Revisitando a Análise Exploratória dos Dados Multivariados. **Química Nova**, [*s. l.*], 2022.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, [*s. l.*], vol. 226, nº 1, p. 497–509, 1957.

FOX, P. F. *et al.* **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

FOX, C. B.; UIBEL, R. H.; HARRIS, J. M. Detecting Phase Transitions in Phosphatidylcholine Vesicles by Raman Microscopy and Self-Modeling Curve Resolution. **The Journal of Physical Chemistry B**, [*s. l.*], vol. 111, nº 39, p. 11428–11436, 2007.

GABER, B. P.; YAGER, P.; PETICOLAS, W. L. Deuterated phospholipids as nonperturbing components for Raman studies of biomembranes. **Biophysical Journal**, [*s. l.*], vol. 22, nº 2, p. 191–207, 1978.

GALLIER, S. *et al.* Composition of bovine milk fat globules by confocal Raman microscopy. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 21, nº 6, p. 402–412, 2011.

GALVAN, D. *et al.* Recent Applications of Mixture Designs in Beverages, Foods, and Pharmaceutical Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Foods**, [*s. l.*], vol. 10, nº 8, p. 1941, 2021.

GANTNER, V. The overall and fat composition of milk of various species. **Mljekarstvo**, [*s. l.*], p. 223–231, 2015.

GAO, R. *et al.* Accurate determination of the Ca2+ activity in milk-based systems by Ca-ISE: Effects of ionic composition on the single Ca2+ activity coefficient and liquid junction potentials. **Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 129, nº 2, p. 619–623, 2011.

GARCIA, A.; ALTING, A.; HUPPERTZ, T. Disruption of casein micelles by calcium sequestering salts: From observations to mechanistic insights. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 142, p. 105638, 2023.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, [*s. l.*], vol. 45, nº 4, p. 473–483, 2005.

GENIS, D. O. *et al.* Determination of milk fat authenticity in ultra-filtered white cheese by using Raman spectroscopy with multivariate data analysis. **Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 336,

p. 127699, 2021.

HASAN, T.; HUSSAIN, S. A. I-optimal Designs for three and four component mixture models in orthogonal blocks. **Pakistan Journal of Statistics and Operation Research**, [*s. l.*], p. 943–954, 2022.

HEWAVITHARANA, A. K.; VAN BRAKEL, B. Fourier Transform Infrared Spectrometric Method for the Rapid Determination of Casein in Raw Milk. **The Analyst**, [*s. l.*], vol. 122, nº 7, p. 701–704, 1997.

HOLT, C. *et al.* Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], vol. 96, nº 10, p. 6127–6146, 2013.

HORNE, D. S. **Letter to the editor: Casein micelles or casein supramolecules?**. [*S. l.*]: [*s. d.*], 2010.

HUANG, W. *et al.* Rapid evaluation of milk acidity and identification of milk adulteration by Raman spectroscopy combined with chemometrics analysis. **Vibrational Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 123, p. 103440, 2022.

JOLLIFFE, I. T. **Principal Component Analysis**. New York, NY: Springer New York, 1986.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [*s. l.*], vol. 374, nº 2065, p. 20150202, 2016.

JUKKOLA, A. *et al.* Food emulsifiers based on milk fat globule membranes and their interactions with calcium and casein phosphoproteins. **Food Hydrocolloids**, [*s. l.*], vol. 94, p. 30–37, 2019.

KERN, L. *et al.* Chemical fractionation of caseins by differential precipitation: influence of pH, calcium addition, protein concentration and temperature on the depletion in α- and β-caseins. **International Journal of Food Science & Technology**, [*s. l.*], vol. 55, nº 2, p. 542–552, 2020.

KITT, J. P. *et al.* Confocal Raman Microscopy for in Situ Measurement of Phospholipid-Water Partitioning into Model Phospholipid Bilayers within Individual Chromatographic Particles. **Analytical Chemistry**, [*s. l.*], vol. 90, nº 11, p. 7048–7055, 2018.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, [*s. l.*], vol. 64, nº 1, p. 1–13, 2011.

LI, W.; HUANG, W.; FAN, D.; GAO, X.; ZHANG, X.; MENG, Y.; LIU, T. C.-Y. Rapid quantification of goat milk adulteration with cow milk using Raman spectroscopy and chemometrics. **Analytical Methods**, v. 15, n. 4, p. 455-461, 2023.

LIMA, R. R. *et al.* Synergism Interactions of Plant-Based Proteins: Their Effect on Emulsifying Properties in Oil/Water-Type Model Emulsions. **Applied Sciences**, [*s. l.*], vol. 14, nº 17, p. 8086, 2024.

LIU, D. Z. *et al.* Temperature-dependent dynamics of bovine casein micelles in the range 10–40°C. **Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 141, nº 4, p. 4081–4086, 2013.

LIU, Z.; MOATE, P.; ROCHFORT, S. A simplified protocol for fatty acid profiling of milk fat without lipid extraction. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 90, p. 68–71, 2019.

LOPEZ, C.; CAUTY, C.; GUYOMARC'H, F. Unraveling the Complexity of Milk Fat Globules to Tailor Bioinspired Emulsions Providing Health Benefits: The Key Role Played by the Biological Membrane. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [*s. l.*], vol. 121, nº 1, 2019.

MAGENIS, R. B. *et al.* A Control Method To Inspect the Compositional Authenticity of Minas Frescal Cheese by Gel Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 62, nº 33, p. 8333–8339, 2014.

MAZUREK, S. *et al.* Analysis of milk by FT-Raman spectroscopy. **Talanta**, [*s. l.*], vol. 138, p. 285–289, 2015.

MENDES, T. O. *et al.* Vibrational spectroscopy for milk fat quantification: line shape analysis of the Raman and infrared spectra. **Journal of Raman Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 47, nº 6, p. 692–698, 2016.

MOHAMMADI, S. *et al.* Prediction of milk composition using multivariate chemometric modelling of infrared, Raman, and fluorescence spectroscopic data: A review. **Food Control**, [*s. l.*], vol. 165, p. 110658, 2024.

NICOLAIS, T.; CHASSENIEUX, C. Heat induced geletion of casein micelles. **Elsevier**, [*s. l.*], vol. 118, 2021.

NIEUWENHUIJSE, H.; HUPPERTZ, T. Heat-induced changes in milk salts: A review. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 126, p. 105220, 2022.

OLIVEIRA, W. F. de *et al.* Production, chemical composition, and economic viability of Minas Frescal cheese from buffaloes supplemented with açai seed. **Tropical Animal Health and Production**, [*s. l.*], vol. 52, nº 5, p. 2379–2385, 2020.

OLIVEIRA, T. L. *et al.* Study of the synergistic effect of sodium citrate and phosphates on the colloidal stability of skim milk under controlled severe heat treatment conditions. **International Journal of Dairy Technology**, [*s. l.*], vol. 79, nº 2, 2026.

OLIVEIRA, T. L.; OLIVEIRA, G. de P.; OLIVEIRA, L. F. C. de. A new way to identify the composition of lipids in milk from different animal species by Raman and infrared spectroscopy. **Food and Humanity**, [*s. l.*], vol. 6, p. 101009, 2026.

ONG, S. L. *et al.* Ruminant Milk-Derived Extracellular Vesicles: A Nutritional and Therapeutic Opportunity?. **Nutrients**, [*s. l.*], vol. 13, nº 8, p. 2505, 2021.

PASTORINO, A. J.; HANSEN, C. L.; MCMAHON, D. J. Effect of pH on the Chemical Composition and Structure-Function Relationships of Cheddar Cheese. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], vol. 86, nº 9, p. 2751–2760, 2003.

PEREIRA, D. B. C. *et al.* **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, [*s. l.*], vol. 27, nº 2, p. 293–300, 2004.

PIRUTIN, S. K. *et al.* Vibrational Spectroscopy as a Tool for Bioanalytical and Biomonitoring Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], vol. 24, nº 8, p. 6947, 2023.

PUREVSUREN, B. A biochar from casein and its properties. **Journal of Materials Science**, [*s. l.*], vol. 38, nº 11, p. 2347–2351, 2003.

RENHE, I. R. T.; INDRIS, L. M.; CORREDIG, M. Effect of calcium chelators on heat stability and heat-induced changes of milk microfiltered concentrates. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 82, p. 4–10, 2018.

RENHE, I. R. T.; ZHAO, Z.; CORREDIG, M. A comparison of the heat stability of fresh milk protein concentrates obtained by microfiltration, ultrafiltration and diafiltration. **Journal of Dairy Research**, [*s. l.*], vol. 86, nº 3, p. 347–353, 2019.

ROHMAN, A.; WINDARSIH, A. **The application of molecular spectroscopy in combination with chemometrics for halal authentication analysis: A review**. [*S. l.*]: MDPI AG, 2020.

ROJAS-CANDELAS, L. E. *et al.* Characterization of Structural Changes of Casein Micelles at Different pH Using Microscopy and Spectroscopy Techniques. **Microscopy and Microanalysis**, [*s. l.*], vol. 28, nº 2, p. 527–536, 2022.

SAHA, P. *et al.* Isolation and characterisation of micellar casein from buffalo milk using microfiltration technique with modified buffer composition. **International Journal of Dairy Technology**, [*s. l.*], vol. 75, nº 2, p. 308–320, 2022.

SAKKAS, L.; PAPPAS, C. S.; MOATSOU, G. FT-MIR Analysis of Water-Soluble Extracts during the Ripening of Sheep Milk Cheese with Different Phospholipid Content. **Dairy**, [*s. l.*], vol. 2, nº 4, p. 530–541, 2021.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2008.

SANGALETTI, N. *et al.* Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [*s. l.*], vol. 29, nº 2, p. 262–269, 2009.

SANT'ANA, A. M. S. *et al.* Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], vol. 96, nº 12, p. 7442–7453, 2013.

SCHEFFÉ, H. Experiments with Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology**, [*s. l.*], vol. 20, nº 2, p. 344–360, 1958.

SCUDINO, H. *et al.* Thermosonication as a pretreatment of raw milk for Minas frescal cheese production. **Ultrasonics Sonochemistry**, [*s. l.*], vol. 92, p. 106260, 2023.

SILVA, F. L. da *et al.* Effects of calcium chloride substitution on the physicochemical properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Dairy Research**, [*s. l.*], vol. 90, nº 2, p. 186–190, 2023.

SILVA, P. H. F. da. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, [*s. l.*], nº 6, p. 3–5, 1997. Disponível em: https://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc06/quimsoc.pdf. Acesso em: 15 jul. 2026.

SILVA, F. T. **Queijo Minas Frescal**. Brasília, DF: [*s. d.*], 2005. Disponível em: www.ctaa.embrapa.br. .

SILVA, M. G. *et al.* Raman spectroscopy in the quality analysis of dairy products: A literature review. **Journal of Raman Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 52, nº 12, p. 2444–2478, 2021.

SILVA, Thamiris Evangelista *et al.* Shelf life study of handmade and industrially processed Minas frescal cheese. **Nutrition & Food Science**, [*s. l.*], vol. 49, nº 6, p. 1207–1218, 2019.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, [*s. l.*], vol. 57, nº 2–3, p. 111–119, 2004. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.2004.00143.x.

SINGH, J. *et al.* Ultra high temperature (UHT) stability of casein-whey protein mixtures at high protein content: Heat induced protein interactions. **Food Research International**, [*s. l.*], vol. 116, p. 103–113, 2019.

SMITH, G. P. S. *et al.* Raman imaging processed cheese and its components. **Journal of Raman Spectroscopy**, [*s. l.*], vol. 48, nº 3, p. 374–383, 2017.

STEFANOV, I. *et al.* Determination of butter adulteration with margarine using Raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 59, nº 24, p. 12771–12783, 2011.

STEFANOV, I.; VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V. A novel procedure for routine milk fat extraction based on dichloromethane. **Journal of Food Composition and Analysis**, [*s. l.*], vol. 23, nº 8, p. 852–855, 2010.

SUH, J. H. Critical review: Metabolomics in dairy science – Evaluation of milk and milk product quality. **Food Research International**, [*s. l.*], vol. 154, p. 110984, 2022.

TADJINE, D. *et al.* Pasteurization effects on yield and physicochemical parameters of cheese in cow and goat milk. **Food Science and Technology**, [*s. l.*], vol. 40, nº 3, p. 580–587, 2020.

TAMANINI, R. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, [*s. l.*], vol. 28, nº 3, p. 449, 2007.

TARAKCI, Z.; KUCUKONER, E. Changes on physicochemical, lipolysis and proteolysis of vacuum packed Turkish Kashar cheese during ripening. **Journal of Central European Agriculture**, [*s. l.*], vol. 7, nº 3, p. 459–464, 2006.

TARAPOULOUZI, M.; PAPADEMAS, P. A preliminary study in milk to discriminate goat feeding regimes by FTIR and chemometrics. **Journal of Dairy Research**, [*s. l.*], vol. 91, nº 4, p. 454–459, 2024.

TEIXEIRA, F. S. *et al.* Bioactive Sugarcane Lipids in a Circular Economy Context. **Foods**, [*s. l.*], vol. 10, nº 5, p. 1125, 2021.

TOMASSINI, A. *et al.* NMR-based metabolomics to evaluate the milk composition from Friesian and autochthonous cows of Northern Italy at different lactation times. **Natural Product Research**, [*s. l.*], vol. 33, nº 8, p. 1085–1091, 2019.

TSIOULPAS, A. *et al.* Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 122, nº 4, p. 1027–1034, 2010.

WALSTRA, P. *et al.* **Dairy Science and Technology**. [*S. l.*]: CRC Press, 2005.

WANG, S. *et al.* Characterization and comparison of phospholipid fatty acids and molecular species in different animal milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, [*s. l.*], vol. 121, p. 105420, 2023.

WANG, Q.; MA, Y. Effect of temperature and pH on salts equilibria and calcium phosphate in bovine milk. **International Dairy Journal**, [*s. l.*], vol. 110, p. 104713, 2020.

WEI, W. *et al.* Phospholipid composition and fat globule structure II: Comparison of mammalian milk from five different species. **Food Chemistry**, [*s. l.*], vol. 388, p. 132939, 2022.

WINDARSIH, A. *et al.* The Combination of Vibrational Spectroscopy and Chemometrics for Analysis of Milk Products Adulteration. **International Journal of Food Science**, [*s. l.*], vol. 2021, p. 1–15, 2021.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Nota sobre o método semi-micro Kjeldahl. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ou Revista de Laticínios Cândido Tostes, dependendo do padrão que você estiver adotando; o nome oficial é Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes)**, [*s. l.*], vol. 35, nº 209, p. 39–40, 1980.

WU, J.; CHEN, S.; VAN DER MEEREN, P. Heat Stability Assessment of Milk: A Review of Traditional and Innovative Methods. **Foods**, [*s. l.*], vol. 13, nº 14, p. 2236, 2024.

YAZGAN, N. N. *et al.* Discrimination of milk species using Raman spectroscopy coupled with partial least squares discriminant analysis in raw and pasteurized milk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*s. l.*], vol. 100, nº 13, p. 4756–4765, 2020.

YE, R.; HARTE, F. Casein maps: Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl2 on the particle size of reconstituted casein micelles. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], vol. 96, nº 2,

p. 799–805, 2013.

ZHANG, Z. Y.; JIANG, M. Q.; XIONG, H. M. Optimized identification of cheese products based on Raman spectroscopy and an extreme learning machine. **New Journal of Chemistry**, [*s. l.*], vol. 47, nº 14, p. 6889–6894, 2023.

ZHANG, Z.-Y.; SU, J.-S.; XIONG, H.-M. Technology for the Quantitative Identification of Dairy Products Based on Raman Spectroscopy, Chemometrics, and Machine Learning. **Molecules**, [*s. l.*], vol. 30, nº 2, p. 239, 2025.

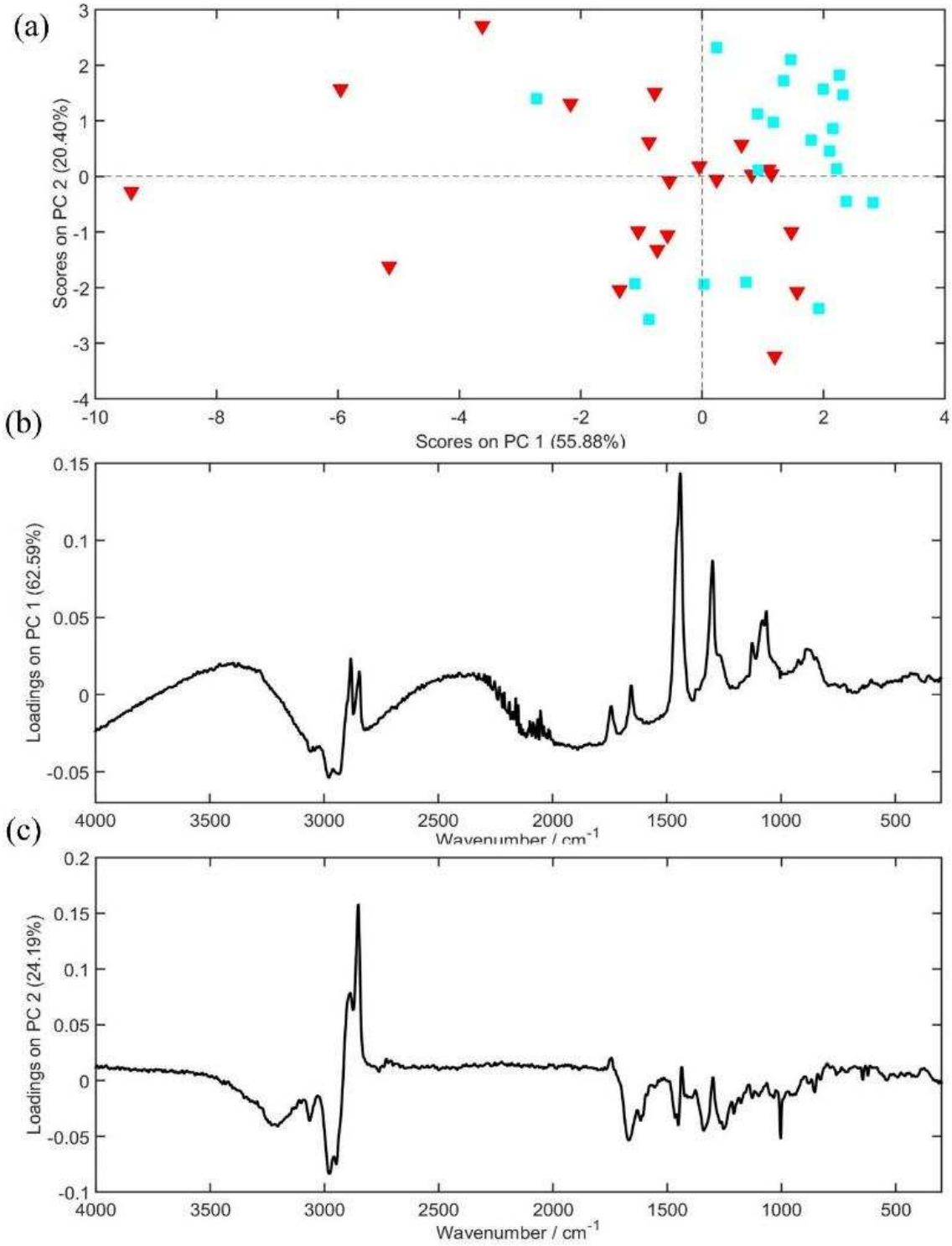
ZHAO, X. *et al.* Predictions of Milk Fatty Acid Contents by Mid-Infrared Spectroscopy in Chinese Holstein Cows. **Molecules**, [*s. l.*], vol. 28, nº 2, p. 666, 2023.

ZHOU, Z. *et al.* Influence of Physiological Gastrointestinal Surfactant Ratio on the Equilibrium Solubility of BCS Class II Drugs Investigated Using a Four Component Mixture Design. **Molecular Pharmaceutics**, [*s. l.*], vol. 14, nº 12, p. 4132–4144, 2017.

ZHUANG, Y. *et al.* Application of confocal Raman microscopy to investigate casein micro-particles in blend casein/pectin films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s. l.*], vol. 74, p. 44–48, 2015.

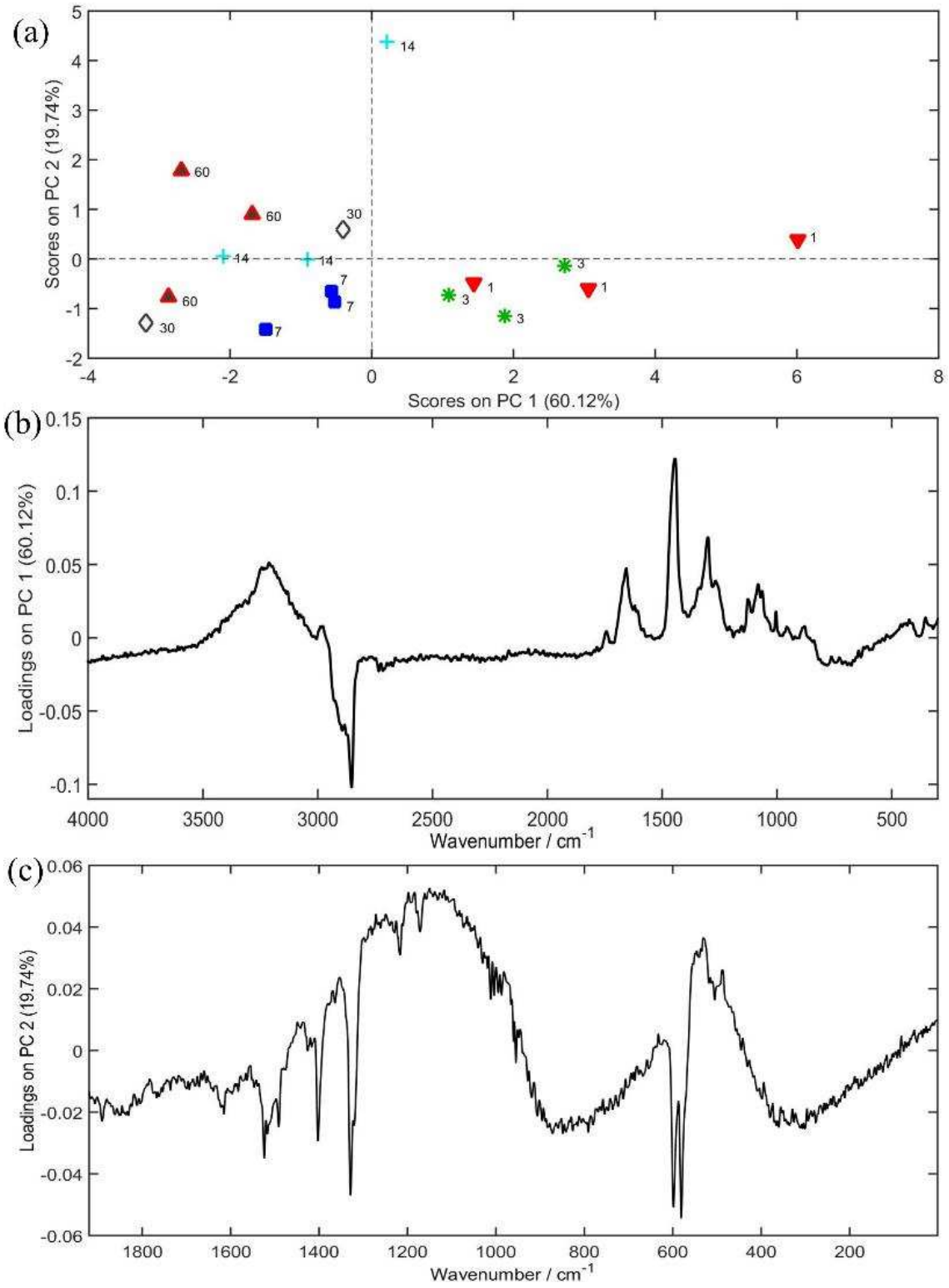
APÊNDICE A – DADOS COMPLEMENTARES

Figura A1– Gráfico de scores da PCA de todos os espectros Raman obtidos dos queijos Minas Frescal industrial (triângulos vermelhos, ▼) e artesanal (quadrados azuis, ■); (b) *loadings* da PC1; e (c) *loadings* da PC2.



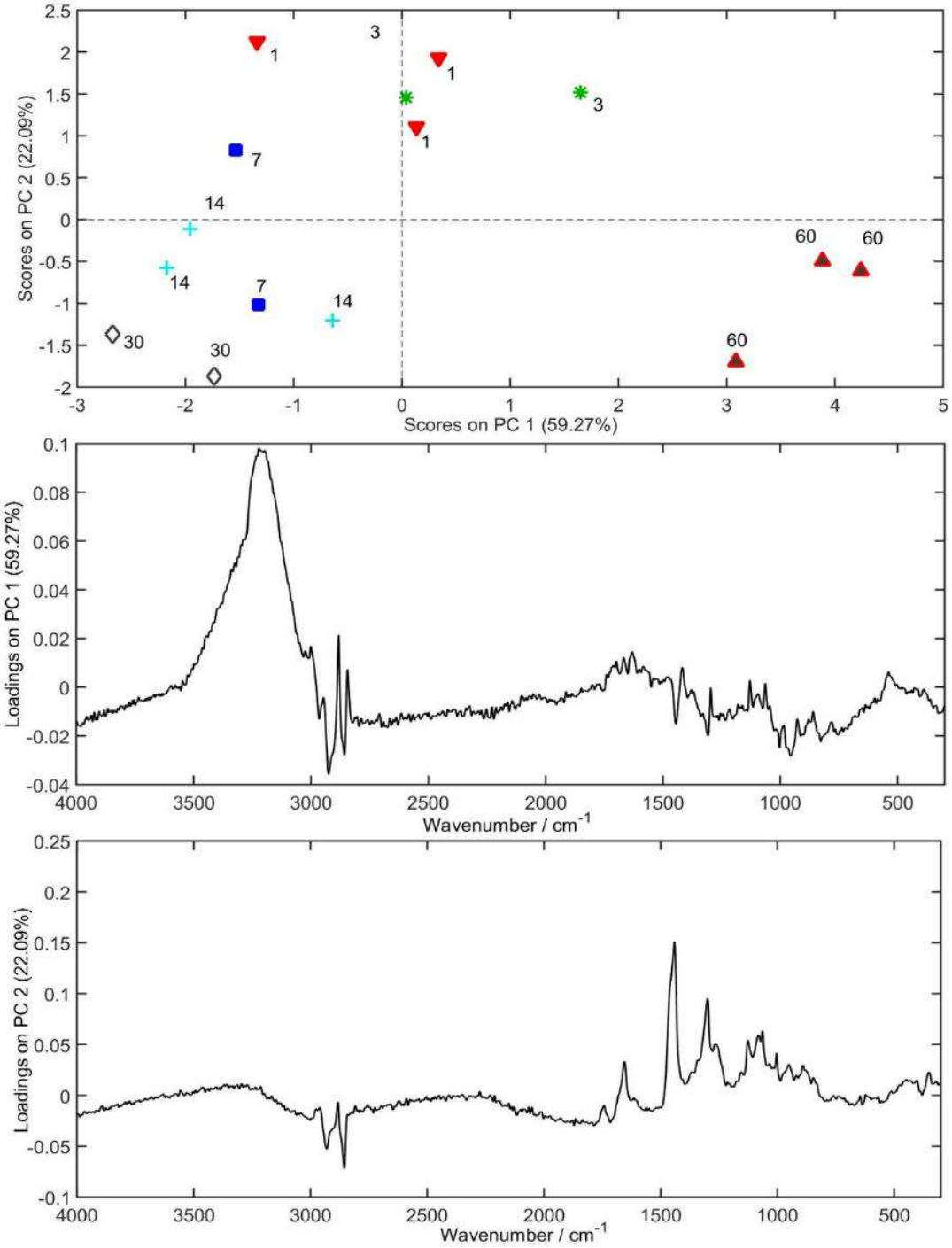
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura A2 – (a) Gráfico de scores da PCA de todos os espectros Raman obtidos do queijo Minas Frescal industrial durante a degradação sob refrigeração (dias 1, 3, 7, 30 e 60); (b) *loadings* da PC1; e (c) *loadings* da PC2.



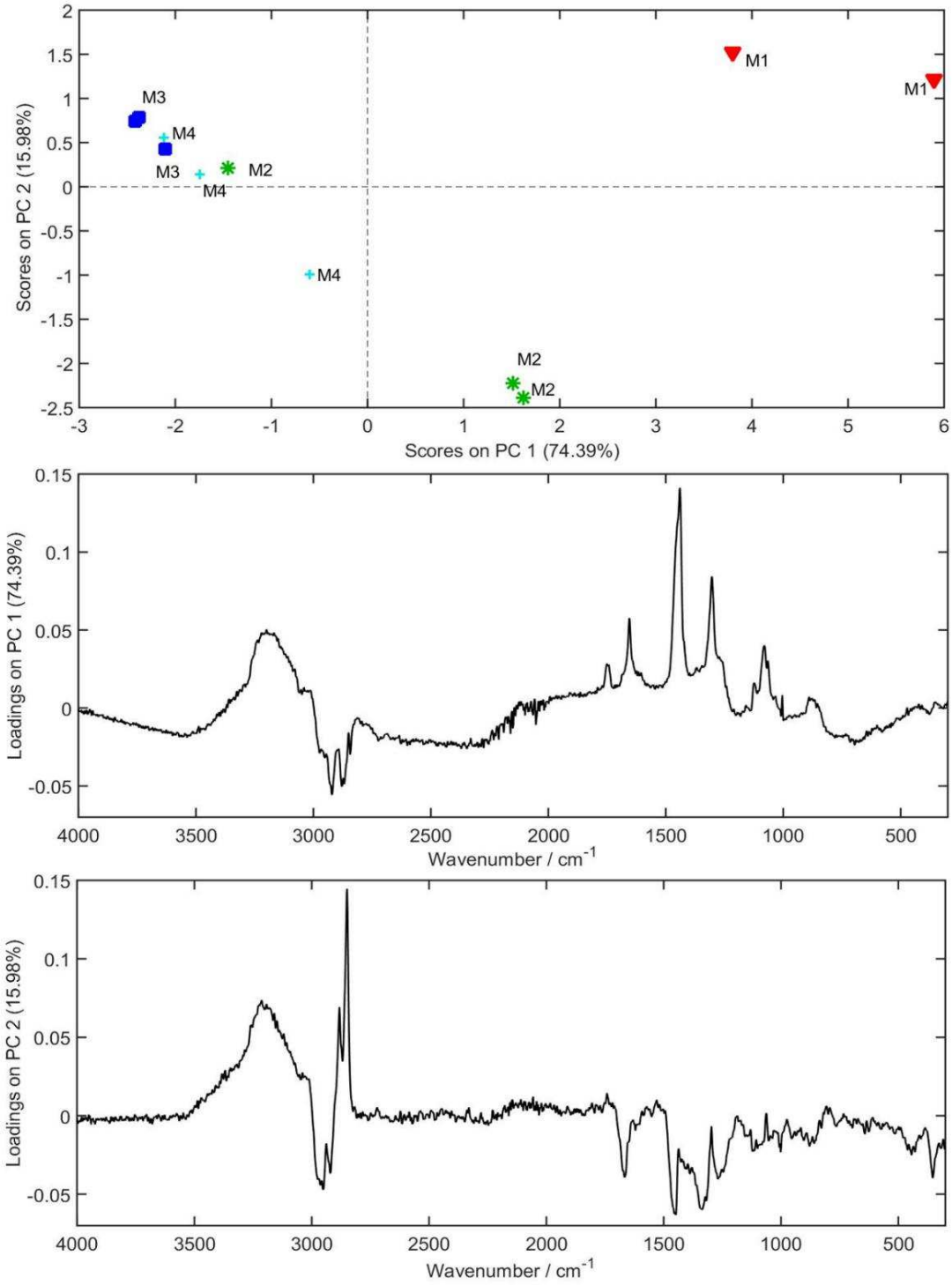
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura A3 – (a) Gráfico de scores da PCA de todos os espectros Raman obtidos do queijo Minas Frescal artesanal durante a degradação sob refrigeração (dias 1, 3, 7, 30 e 60); (b) *loadings* da PC1; e (c) *loadings* da PC2.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura A4 – (a) Gráfico de scores da PCA de todos os espectros Raman obtidos do queijo Minas Frescal industrial durante a degradação em temperatura ambiente (meses 1, 2, 3 e 4); (b) *loadings* da PC1; e (c) *loadings* da PC2.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS

a) Artigos

OLIVEIRA, T. L.; CAMPOS, N. S.; PIMENTEL, C. M.; DESIDERIO, E. C. G.; STEPHANI, R.; OLIVEIRA, L. F. C. Study of the synergistic effect of sodium citrate and phosphates on the colloidal stability of skim milk under controlled severe heat treatment conditions. International Journal of Dairy Technology, v. 79, e70137, 2026. https://doi.org/10.1111/1471-0307.70137

OLIVEIRA, T. L.; OLIVEIRA, G. P.; OLIVEIRA, L. F. C. A new way to identify the composition of lipids in milk from different animal species by Raman and infrared spectroscopy. Food and Humanity, v. 6, p. 101009, 2026. https://doi.org/10.1016/j.foohum.2026.101009

OLIVEIRA, T. L.; CARVALHO, P. S.; OLIVEIRA, L. F. C.; SILVA, M. A. P. Spectroscopic studies of calcium coacervate polyphosphates containing Te(VI) and its decomposition. Spectroscopy Letters, v. 59, n. 6, p. 654-661, 2026. https://doi.org/10.1080/00387010.2025.2543945

SILVA, J. G. F.; CERQUEIRA, I. H.; PARIS JUNIOR, J. A.; SILVA, L. H. D.; COLTURATO, V. M. M.; FERNANDES, P. A.; OLIVEIRA, T. L.; DAMETTO, A. C.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, C. A.; OLIVEIRA, L. F. C.; BARUD, H. S.; RESENDE, F. A. Production of biopolymers from watermelon mesocarp: structural characterization, cytogenotoxicological safety, and antioxidant activity. Journal of Food Science and Technology, v. 62, p. 885-896, 2025. https://doi.org/10.1007/s13197-024-06076-z

FREIRE, A. L.; LIMA, L. R.; CANDIDO, I. C. M.; SILVA, L. G.; RIBEIRO, S. J. L.; CARRILHO, E.; OLIVEIRA, T. L.; OLIVEIRA, L. F. C.; BARUD, H. S.; OLIVEIRA, H. P. Metal-Free, Bio-Triboelectric Nanogenerator Based on a Single Electrode of Bacterial Cellulose Modified with Carbon Black. Nanoenergy Advances, v. 4, n. 1, p. 110-121, 2024. https://doi.org/10.3390/nanoenergyadv4010006

b) Artigos submetidos

OLIVEIRA, T. L.; OLIVEIRA, G. P.; PEIXOTO, L. P. F.; MOREIRA, J. H. P.; STEPHANI, R.; EDWARDS, H. G. M.; OLIVEIRA, L. F. C. Raman spectroscopy combined with chemometrics in the analysis of artisanal and industrial Minas Frescal cheeses from Brazil. Submetido à International Dairy Journal, 2026.