

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Taynan Barroso Landin

**Efeito do tipo de ácido nas características físico-químicas e na determinação da
distribuição mineral da massa coalhada e do soro, durante o processo de coagulação
ácida visando fabricação de Requeijão**

Juiz de Fora

2025

Taynan Barroso Landin

Efeito do tipo de ácido nas características físico-químicas e na determinação da distribuição mineral da massa coalhada e do soro, durante o processo de coagulação ácida visando fabricação de Requeijão

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone

Juiz de Fora

2025

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

Landin, Taynan Barroso.

Efeito do tipo de ácido nas características físico-químicas e na
determinação da distribuição mineral da massa coalhada e do soro,
durante o processo de coagulação ácida visando fabricação de
Requeijão / Taynan Barroso Landin. -- 2025.

97 f. : il.

Orientador: Rodrigo Stephani
Coorientador: Ítalo Tuler Perrone
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. Ácido lático. 2. Ácido clorídrico. 3. Ácido sulfúrico. 4.
Coagulação. 5. Espectroscopia. I. Stephani, Rodrigo, orient. II.
Perrone, Ítalo Tuler , coorient. III. Título.

Taynan Barroso Landin

Efeito do tipo de ácido nas características físico-químicas e na determinação da distribuição mineral da massa coalhada e do soro, durante o processo de coagulação ácida visando fabricação de Requeijão

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

Aprovada em 25 de setembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Stephani - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Leila Maria Spadoti

Instituto de Tecnologia de Alimentos

Dra. Elisângela Ramieres Gomes

Somai Alimentos

Dr. João Pablo Fortes Pereira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 28/08/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 24/09/2025, às 11:06, 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 **Elisangela Ramieres Gomes, Usuário Externo**, em 24/09/2025, às 11:13, 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 **Leila Maria Spadoti, Usuário Externo**, em 24/09/2025, às 11:42, 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 **Joao Pablo Fortes Pereira, Técnico Administrativo em Educação**, em 24/09/2025, às 13:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá, Usuário Externo**, em 25/09/2025, às 15:26, 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 **Italo Tuler Perroni, Professor(a)**, em 26/09/2025, às 03:26, 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 **2585288** e o código CRC **931DF0D4**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser o alicerce de todas as minhas conquistas. É ele quem ilumina meu caminho, me sustenta nos momentos difíceis e renova diariamente minha fé e minha força para continuar trilhando minha jornada com coragem e determinação.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado com amor, incentivo e palavras de encorajamento. Em especial, aos meus pais, Ângela e Luiz, por todo o carinho, dedicação e sacrifícios que fizeram por mim ao longo da vida. Ao meu irmão Caio, deixo um agradecimento carinhoso por ser mais do que um irmão, um companheiro de vida com quem compartilho os desafios que me ajudaram a crescer. Aos meus queridos avós, Irene, Marli e Raimundo, sou imensamente grato pelo amor incondicional, pelas palavras de sabedoria, pela paciência e, acima de tudo, pelas orações que sempre me protegeram e me deram forças nos momentos em que mais precisei.

Ao meu avô Sebastião, dedico uma lembrança especial e carregada de saudade. Agradeço por todos os instantes preciosos que pude viver ao seu lado. Sua presença, mesmo após a partida, continua viva em minhas memórias e no meu coração. Te tenho como um anjo da guarda, e é com emoção que guardo cada lembrança com muito carinho e gratidão.

A todos os amigos que caminham ao meu lado oferecendo apoio, carinho e força nos momentos em que mais preciso. A presença de vocês, ainda que muitas vezes discreta, tem sido essencial para que eu me mantivesse firme nesta trajetória. Um agradecimento especial à Laura, por me permitir fazer parte da vida dos meus afilhados de coração: Felipe, Bernardo e Henrique. E ao Sávio, por todos os conselhos sinceros e pelas risadas compartilhadas. A todos os colegas do Laboratório Bioquimtec, que fizeram parte dessa etapa tão importante da minha vida acadêmica e profissional. Sou verdadeiramente grato por toda a colaboração, apoio e convivência ao longo desse período. Em especial, aos amigos Elisa, Natalia Alves, Nathalia, Heitor, Biany, Ramon, Marcos, Kamilla, João, Maria Eduarda, Laryssa, Igor, Julia Francisquini e Carol Barroso.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Stephani por todo suporte científico, por acreditar no meu trabalho e pelas preocupações e conselhos que ultrapassaram os limites do laboratório e das salas de aula, refletindo um comprometimento genuíno com meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também ao meu coorientador Dr. Ítalo Tuler Perrone por todo auxílio

durante esse projeto. Agradeço também aos demais professores do NEEM/QUIMTEC por todo conhecimento compartilhado.

A todos os membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos da Vilac Foods, em especial a Francisco e José Vieira, pela oportunidade de atuar na área de pesquisa, desenvolvimento e inovação de novos produtos lácteos, bem como a toda a equipe do laboratório pelo apoio, ajuda e constante incentivo

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento que possibilitou a realização desse projeto, e à Universidade Federal de Juiz de Fora, por me acolher desde a graduação em Química.

RESUMO

Esta tese de doutorado teve como objetivo principal estudar o efeito do tipo de ácido na acidificação do leite, nas características físico-químicas e na composição mineral da massa coalhada visando fabricação de Requeijão. Partindo do leite reconstituído armazenado por 24 horas à temperatura de 5 °C, iniciou-se a acidificação do leite mantido à 5 °C sob agitação utilizando ácido lático (85% m/v), ácido clorídrico (37% m/v) e ácido sulfúrico (98% m/v) até atingir os pH de 4,55; 4,70; 4,85 e 5,00. A coagulação do leite foi iniciada com o aumento gradual da temperatura de 5 °C até 55 °C. Após a coagulação, o aglomerado proteico precipitado (massa coalhada) foi drenado com auxílio de um pano dessorador acoplado à um sistema de filtração à vácuo por tempo padronizado de 90 segundos para separação da fase solúvel permeada (soro) e foram realizadas as análises físico-químicas. Os resultados demonstraram que o processo de obtenção da massa coalhada pela acidificação do leite frio possibilita a automação da fabricação em uma operação contínua para a fabricação de Requeijão. O teor de cálcio iônico no leite é influenciado pelo abaixamento do pH, sendo que os ácidos clorídrico e sulfúrico proporcionam uma maior liberação de cálcio da fase coloidal para a fase solúvel. O pH de acidificação do leite influenciou no tempo e temperatura de início de coagulação. As fabricações com ácidos sulfúrico e clorídrico em pH 4,55 tiveram um maior rendimento ajustado em kg de massa/100 kg de leite e o ácido sulfúrico proporcionou maiores perdas na produção. O pH de acidificação do leite influenciou no pH, na umidade e nas características físicas das massas coalhadas. Os soros obtidos nos tratamentos com ácido clorídrico apresentaram maiores valores de cálcio iônico e cálcio iônico em pH 4,00 e influenciou no pH e nas características físicas dos soros. O pH e ácido utilizado na acidificação do leite não influenciou nas concentrações de β -Lactoglobulina, entretanto, houve uma influência nos valores de α -Lactoalbumina. Na caracterização mineral das amostras de cinzas das massas coalhadas, os valores de cálcio fósforo e magnésio foram menores no pH 4,55 nos três ácidos utilizados. O pH de acidificação do leite influenciou na distribuição mineral das amostras de cinzas dos soros. Sendo assim, a produção de massa coalhada utilizando ácido clorídrico para abaixamento do pH até 4,55, proporcionou maior liberação de cálcio da fase coloidal para a fase solúvel, início da coagulação mais rápido, maiores rendimentos e aproveitamento dos constituintes do leite na massa coalhada com menos perdas de processo, maior liberação de cálcio no soro, fazendo com que a massa coalhada fique com menos cálcio e consequentemente melhorando o processo de fusão e um maior aproveitamento das proteínas do soro na massa coalhada.

Palavras-chave: Leite; Ácido lático; Ácido clorídrico; Ácido sulfúrico; Coagulação; Cálcio; Espectroscopia.

ABSTRACT

The main objective of this doctoral thesis was to study the effect of the type of acid on milk acidification, on the physicochemical characteristics and on the mineral composition of the curd mass for the production of Requeijão. Starting from the reconstituted milk stored for 24 hours at 5°C, the acidification of the milk kept at 5°C under agitation was initiated using lactic acid (85% m/v), hydrochloric acid (37% m/v) and sulfuric acid (98% m/v) until reaching pH values of 4.55; 4.70; 4.85 and 5.00. Milk coagulation was initiated by gradually increasing the temperature from 5°C to 55°C. After coagulation, the precipitated protein agglomerate (curdled mass) was drained using a desiccant cloth coupled to a vacuum filtration system for a standardized time of 90 seconds to separate the permeated soluble phase (whey), and physical-chemical analyses were performed. The results demonstrated that the process of obtaining the curdled mass by acidifying cold milk allows the automation of production in a continuous operation for the production of Requeijão. The ionic calcium content in milk is influenced by the lowering of pH, with hydrochloric and sulfuric acids providing a greater release of calcium from the colloidal phase to the soluble phase. The acidification pH of the milk influenced the time and temperature of the start of coagulation. Production with sulfuric and hydrochloric acids at pH 4.55 had a higher adjusted yield in kg of mass/100 kg of milk, and sulfuric acid provided greater losses in production. The pH of milk acidification influenced the pH, moisture and physical characteristics of the curdled masses. The wheys obtained in the treatments with hydrochloric acid presented higher values of ionic calcium and ionic calcium at pH 4.00 and influenced the pH and physical characteristics of the wheys. The pH and acid used in milk acidification did not influence the concentrations of β -Lactoglobulin, however, there was an influence on the values of α -Lactoalbumin. In the mineral characterization of the ash samples of the curdled masses, the values of calcium, phosphorus and magnesium were lower at pH 4.55 in the three acids used. The pH of milk acidification influenced the mineral distribution of the ash samples of the wheys. Therefore, the production of curd mass using hydrochloric acid to lower the pH to 4.55 provided greater release of calcium from the colloidal phase to the soluble phase, faster onset of coagulation, higher yields and use of milk constituents in the curd mass with fewer process losses, greater release of calcium in the whey, causing the curd mass to have less calcium and consequently improving the fusion process and greater use of whey proteins in the curd mass.

Keywords: Milk; Lactic acid; Hydrochloric acid; Sulfuric acid; Coagulation; Calcium; Spectroscopy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do leite de vaca (g.100g-1).....	21
Tabela 2 - Frações das proteínas do leite em relação ao valor total (% m/m).....	24
Tabela 3 - Composição salina do leite de vaca.....	28
Tabela 4 - Classificação do soro de acordo com a obtenção e processos tecnológicos empregados.....	33
Tabela 5 - Requisitos físico-químicos para os diferentes Requeijões	36
Tabela 6 - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação das frações proteicas α -LA e β -LG.....	46
Tabela 7 - Caracterização físico-química do leite reconstituído utilizado nas fabricações das massas coalhada*	48
Tabela 8 - Valores médios de pH das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH*	58
Tabela 9 - Valores médios de pH dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH*	64
Tabela 10 - Valores médios de umidade dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m)*.....	69
Tabela 11 - Tamanho das partículas dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH antes e depois da centrifugação (nm)* .	722
Tabela 12 - Concentrações de β -LG e α -LA nos soros obtidos no processo coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (mg.kg-1)*.....	74
Tabela 13 - Composição mineral média das cinzas dos leites reconstituídos (mM)* ...	77
Tabela 14 - Valores médios de RMF das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m)*	78
Tabela 15 - Resumo da concentração média dos principais elementos minerais das massas coalhadas.....	80
Tabela 16 - Valores médios de RMF dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m)*	83
Tabela 17 - Resumo da concentração média dos principais elementos minerais dos soros (mmol.kg ⁻¹).	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das frações proteicas que formam as micelas de caseína.....	26
Figura 2 - Equipamento adaptado para alterações de temperatura com cubar com agitação individual.....	40
Figura 3 - Delineamento experimental (n=3)	41
Figura 4 - Cromatogramas dos padrões de α -LA e β -LG determinados em HPLC.	45
Figura 5 - Valores médios de cálcio iônico do leite acidificado com diferentes ácidos e em diferentes pH medidos na temperatura de 5°C (mM)*.....	49
Figura 6 - Tempo e temperatura médios de início da coagulação do leite com diferentes ácidos e diferentes pH*.....	522
Figura 7 - Percentual médio de soro, massa coalhada e perdas do processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m) *.....	544
Figura 8 - Rendimento ajustado (kg massa coalhada/100 kg de leite)*.....	577
Figura 9 - Umidade % (m.m-1) e características físicas das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH*.	60
Figura 10 - Umidade das massas coalhadas obtidas após a coagulação do leite acidificado com diferentes ácidos e em diferentes pH.	60
Figura 11 - Recuperação dos constituintes sólidos do leite para as massas coalhadas e para os soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH % (m.m-1)*.....	62
Figura 12 - Valores médios de cálcio iônico dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH medidos na temperatura de 5°C (mM)*.	65
Figura 13 - Valores médios de cálcio iônico em pH 4,00 dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH medidos na temperatura de 5 °C (mM)*.....	67
Figura 14 - Soros obtidos após o processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH.....	70
Figura 15 - Eletroforese em gel dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH.....	76
Figura 16 - Espectro de energia dispersiva de raios X.	80
Figura 17 - Principais minerais das cinzas das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (mM)*.....	81

Figura 18 - Principais minerais das cinzas dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (mM)*..... 85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE	20
3.1.1 Proteínas do leite.....	23
3.1.2 Composição salina do leite.....	28
3.2 COAGULAÇÃO	30
3.2.1 Coagulação Enzimática.....	30
3.2.2 Coagulação Ácida	31
3.2.3 Soro de Leite	32
3.2.4 Massa coalhada: características e aplicações	34
3.3 REQUEIJÃO	35
3.4 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA	37
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS	39
4.2 ANÁLISES	41
4.2.1 Análises Físico-Químicas do Leite.....	41
4.2.2 Monitoramento do Processo de Coagulação	42
4.2.3 Cálculo de Balanço de Massa e Rendimento Ajustado	42
4.2.4 Análises Físico-Químicas das Massas Coalhada.....	43
4.2.5 Análises Físico-Químicas dos Soros	44
4.2.5.1 Caracterização do Perfil Proteico dos Soros.....	45
4.2.6 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral das amostras de leite, massa coalhada e soro.....	46
4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO	47
5 RESULTADOS	48
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE	48
5.1.2 Acompanhamento do Processo de Coagulação.....	51
5.2 BALANÇO DE MASSA E RENDIMENTO AJUSTADO	53
5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MASSAS COALHADAS	58
5.3.1 pH das massas coalhadas	58

5.3.2 Umidade das massas coalhadas	59
5.3.3 Recuperação dos constituintes sólidos do leite.....	61
5.4 ANALISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOROS	63
5.4.1 pH dos soros	63
5.4.2 Cálcio iônico do soro.....	65
5.4.2.1 Cálcio iônico em pH 4,00.....	66
5.4.3 Umidade dos soros.....	68
5.4.4 Tamanho de partículas dos soros	69
5.4.5 Proteínas do soro	73
5.5 RESÍDUO MINERAL FIXO E CARACTERIZAÇÃO MINERAL DAS CINZAS DO LEITE, MASSA COALHADA E SORO	77
5.5.1 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral do leite	77
5.5.2 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral das massas coalhadas	78
5.5.3 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral dos soros	83
6 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O trabalho apresentado neste documento é um projeto de química e tecnologia na área de alimentos, vinculado ao Programa MAI/DAI da UFJF, em parceria com uma empresa multinacional que beneficia e processa o leite para a produção de derivados lácteos. O objetivo geral é estudar o efeito do tipo de ácido na acidificação do leite, nas características físico-químicas e na composição mineral da massa coalhada visando fabricação de Requeijão.

O título do trabalho engloba a etapa de coagulação do leite por acidificação direta. Com esse processo, obtemos dois produtos distintos: a massa coalhada que é destinada a fabricação do Requeijão e o soro do leite, um líquido rico em nutrientes que por muito tempo foi considerado um subproduto da indústria de laticínios, mas que nos dias atuais é utilizado na sua forma *in natura*, desidratado, ou até mesmo na extração de seus componentes, como ingrediente na fabricação de outros produtos da indústria de alimentos ou farmacêutica.

A coagulação do leite quente por acidificação direta para a obtenção da massa coalhada, é realizada na indústria de laticínios em bateladas, e proporciona um menor tempo de processo e maior uniformidade nas produções. Estudar o efeito da acidificação do leite em baixas temperaturas, possibilita a otimização do processo de fabricação para uma operação contínua. Entretanto, foi preciso entender o efeito da acidificação direta por diferentes ácidos e em diferentes valores de pH a baixa temperatura no rendimento de fabricação e nas características físico-químicas da massa coalhada e do soro de leite gerados com esse novo método.

O monitoramento do processo de acidificação em baixa temperatura foi realizado para entender o comportamento do cálcio, mineral importante na coagulação do leite, a influência no tempo e temperatura de coagulação do leite e nas características físico-químicas da massa coalhada que será usada para a fabricação de Requeijão. Também foi avaliado, o perfil proteico do soro gerado nesses processos. Essa caracterização se torna importante, uma vez que a proteína presente no soro do leite é considerada um componente com importante valor comercial e nutricional.

A característica e composição da massa coalhada é um fator importante para a fabricação do Requeijão e é um ponto importante a ser estudado, uma vez que esse queijo é um dos mais produzidos e consumidos no Brasil, estando presente em 64,5% das casas brasileiras segundo dados do Diário Agrícola de 2022. É um queijo que pertence ao grupo

dos queijos fundidos por passar pelo processo de fusão sob agitação e aquecimento, onde o pH e o equilíbrio salino da massa coalhada influenciam na qualidade do produto final. Alterações no processo de coagulação do leite podem influenciar na cifra de transição dos componentes do leite que vão para a massa coalhada ou para o soro, alterando as características dos mesmos. Portanto, esse trabalho visa gerar conhecimentos científicos que permitam compreender melhor a etapa de coagulação do leite para otimização na indústria de laticínios, e as características físico-químicas da massa coalhada e do soro, quando obtidos pelo processo de acidificação direta do leite por diferentes ácidos e valores de pH a baixa temperatura.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito do tipo de ácido na acidificação do leite, nas características físico-químicas e na composição mineral da massa coalhada visando fabricação de Requeijão.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos do trabalho, estão:

- a) Analisar as características físico-químicas e o teor de cálcio do leite desnatado reconstituído;
- b) Avaliar a distribuição mineral do leite pela técnica de MEV/EDS;
- c) Acidificar o leite desnatado com diferentes ácidos e em diferentes valores de pH (4,55; 4,70; 4,85 e 5,00) a baixa temperatura (5 °C);
- d) Avaliar a distribuição de cálcio iônico dos leites acidificados a frio;
- e) Avaliar o efeito dos diferentes ácidos e valores de pH no processo de obtenção das massas coalhadas;
- f) Realizar o balanço de massa e os cálculos de rendimento ajustado do processo de obtenção das massas coalhadas;
- g) Avaliar as características físico-químicas das massas coalhadas produzidas;
- h) Avaliar a distribuição mineral das massas coalhadas produzidas a partir dos diferentes ácidos e valores de pH pela técnica de MEV/EDS;
- i) Avaliar as características físico-químicas e o teor de cálcio dos soros obtidos nos processos de coagulação;
- j) Avaliar o perfil proteico dos soros obtidos nos processos de coagulação pelos métodos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e eletroforese em gel;
- k) Avaliar a distribuição mineral dos soros obtidos nos processos de coagulação pela técnica de MEV/EDS;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico deste trabalho aborda as informações essenciais sobre os temas discutidos ao longo da pesquisa.

3.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

O leite é amplamente reconhecido como um alimento completo e de alta qualidade nutricional. Essa designação se deve à sua composição naturalmente equilibrada e diversificada, sendo constituído por proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais em proporções adequadas para a nutrição humana. Trata-se de um produto de consumo rotineiro em todo o mundo, podendo ser ingerido em sua forma natural, como também em versões processadas, como o leite em pó ou em diversos derivados, entre os quais se destacam os queijos, iogurtes, sobremesas lácteas e outros produtos desenvolvidos a partir da matéria-prima láctea (Muller, 2002).

O elevado valor nutritivo do leite está relacionado, sobretudo, à presença de proteínas de alta qualidade biológica, compostas por aminoácidos essenciais digestíveis (DIAAS), além de componentes lipídicos com propriedades funcionais, como os elementos anticancerígenos encontrados na gordura do leite. Entre esses compostos, destacam-se o ácido linoleico conjugado (CLA), o ácido butírico, o β -caroteno e as vitaminas lipossolúveis A e D, que atuam positivamente na saúde humana. Outro ponto de destaque é o fato de o leite representar a principal fonte alimentar de cálcio com alta biodisponibilidade, o que o torna essencial para a saúde óssea e para várias funções fisiológicas (Trevisan, 2008; Jelinska *et al.*, 2017; Herreman *et al.*, 2020).

De acordo com a definição estabelecida pela Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002 (IN51), o leite é o produto resultante da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias, bem alimentadas, descansadas e mantidas em boas condições de higiene. Essa ordenha deve ocorrer em ambiente adequado, garantindo a qualidade microbiológica e físico-química do produto final. Caso o leite seja proveniente de outras espécies animais, como cabras, ovelhas ou búfalas, a legislação determina que o produto deve ser rotulado e identificado conforme a espécie de origem (Brasil, 2002).

A composição do leite não é estática e pode variar significativamente de acordo com diversos fatores, entre esses, estão a espécie e a raça do animal, a idade, o estágio de lactação, o tipo de alimentação oferecida, assim como seu estado de saúde e bem-estar

geral. Apesar de sua complexidade, que envolve a presença de mais de 100.000 diferentes moléculas já identificadas, é possível resumir a composição básica do leite em cinco principais grupos de componentes: água, gorduras, proteínas, lactose e sais minerais, como ilustrado na Tabela 1 (Fox, 2009).

Tabela 1 - Composição do leite de vaca (g.100g⁻¹).

Componentes	Composição média do leite	Instrução Normativa nº 76 do MAPA de 2018	Variação
Água (g.100g ⁻¹)	87,1	-	85,3 - 88,7
Gorduras (g.100g ⁻¹)	4,0	mínimo 3,0	2,5 - 5,5
Lactose (g.100g ⁻¹)	4,6	mínimo 4,3	3,8 - 5,3
Proteínas (g.100g ⁻¹)	3,3	mínimo 2,9	2,3 - 4,4
Minerais (g.100g ⁻¹)	0,7	-	0,57 - 0,83
Sólidos não gordurosos (g.100g ⁻¹)	8,9	mínimo 8,4	7,9 - 10,0
Sólidos Totais (g.100g ⁻¹)	12,9	mínimo 11,4	11,3 - 14,7

Fonte: adaptado de Walstra; Jenness, 2006; Brasil, 2018.

A água constitui o componente predominante na composição do leite, representando entre 87% e 90% do total, dependendo de fatores como a espécie do animal, dieta e condições fisiológicas. Essa alta proporção de água é fundamental para a função do leite como meio de transporte e dispersão dos demais constituintes. Os carboidratos, proteínas, sais minerais e algumas vitaminas estão dissolvidos ou suspensos na fase aquosa, enquanto a gordura e as vitaminas lipossolúveis se encontram em emulsões. Essa rica composição e a forma com que os constituintes do leite se encontram na água é o que conferem ao leite suas características físicos-químicas únicas (Walstra; Jenness, 2006).

A gordura do leite, por sua vez, não está dissolvida, mas dispersa na forma de pequenos glóbulos emulsionados na água. Cada glóbulo de gordura é envolvido por uma membrana lipoproteica natural composta majoritariamente por fosfolipídios. Essa estrutura apresenta uma porção polar, que interage com a água, e uma porção apolar, que interage com os lipídios, conferindo estabilidade à emulsão e impedindo a coalescência dos glóbulos. Essa organização é essencial para manter a distribuição uniforme da gordura no leite. No conteúdo lipídico, encontram-se ácidos graxos saturados e insaturados, com destaque para os de cadeia curta e média, que conferem sabor característico e são rapidamente metabolizados. Além disso, a gordura do leite é essencial para a absorção de

vitaminas lipossolúveis, como as vitaminas A, D, E e K, contribuindo para a qualidade nutricional do produto (Knight *et al.*, 1994).

A lactose, principal carboidrato presente no leite, é um dissacarídeo composto por uma unidade de glicose e uma de galactose. Representa uma fração significativa dos sólidos totais não gordurosos do leite. A lactose tem papel importante na manutenção da pressão osmótica do leite e contribui substancialmente para seu valor energético. Além disso, ela é fermentada por bactérias ácido-láticas durante a produção de derivados como iogurtes e queijos, sendo fundamental para o desenvolvimento do sabor e da textura desses produtos (Hurley, 1999).

As proteínas do leite podem ser divididas em dois grandes grupos, com base em seu estado físico e funcional no leite: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas estão presentes em forma de micelas, que são estruturas coloidais complexas com diâmetro variando entre 50 e 500 nanômetros. Estas micelas são responsáveis por muitas das propriedades funcionais do leite, incluindo sua capacidade de coagulação, essencial para a fabricação de queijos. Já as proteínas do soro, também conhecidas como proteínas solúveis, permanecem dispersas em solução molecular e incluem a beta-lactoglobulina, a alfa-lactoalbumina, imunoglobulinas e outras proteínas bioativas. O leite é uma fonte completa de proteínas porque contém todos os aminoácidos essenciais, ou seja, aqueles que o organismo humano não é capaz de sintetizar e que devem ser obtidos por meio da alimentação. A presença equilibrada desses aminoácidos é um dos principais motivos pelos quais o leite é considerado um dos alimentos mais completos e valiosos do ponto de vista nutricional (Muller *et al.*, 2021).

Os minerais presentes no leite, embora correspondam a uma fração relativamente pequena da composição total, desempenham papéis funcionais essenciais. Eles contribuem para a estabilidade estrutural das proteínas, afetam as características organolépticas como sabor e textura, e influenciam diretamente processos tecnológicos, como a coagulação do leite na produção de queijos. Minerais como cálcio, fósforo, potássio, magnésio e zinco estão presentes em proporções significativas, sendo o cálcio particularmente relevante pela sua alta biodisponibilidade. A interação entre esses minerais e as proteínas, especialmente as caseínas, é fundamental para o comportamento físico-químico do leite durante o processamento industrial (Mephan *et al.*, 1992; Fox, 2009).

3.1.1 Proteínas do leite

As proteínas constituem, em média, cerca de 3,3% da composição total do leite, sendo consideradas um dos principais componentes em termos de valor biológico e funcionalidade tecnológica. Essas proteínas podem ser classificadas em dois grandes grupos distintos, com base em suas características físico-químicas e comportamento durante o processamento: as caseínas e as proteínas do soro (Mezzamo, 2023).

Dentre esses dois grupos, as caseínas representam a fração predominante no conteúdo proteico do leite, correspondendo a aproximadamente 83,85% do total de proteínas presentes. As caseínas são fosfoproteínas que se organizam estruturalmente em micelas, formando agregados estáveis de grande importância para a estabilidade coloidal do leite. Essas micelas desempenham papel fundamental na fabricação de queijos e outros derivados fermentados, uma vez que são diretamente envolvidas nos processos de coagulação e na retenção de cálcio e fósforo. As quatro principais subclasses de caseínas encontradas no leite bovino são: α_1 -caseína, α_2 -caseína, β -caseína e κ -caseína, cada uma com funções e características específicas (Padilla Doval; Zambrano Artega, 2021).

Por outro lado, as proteínas do soro, que compreendem aproximadamente 16,25% da fração proteica total do leite, são solúveis na fase aquosa. Esse grupo de proteínas inclui diversas moléculas bioativas, como a β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina, as imunoglobulinas, a lactoferrina, a albumina do soro bovino e as enzimas presentes naturalmente no leite. Essas proteínas possuem alta digestibilidade, importante valor nutricional e propriedades funcionais que as tornam úteis na indústria de alimentos, especialmente em produtos com apelo proteico, como suplementos nutricionais e fórmulas infantis (Batista *et al.*, 2023).

A proporção entre caseínas e proteínas do soro, conforme demonstrado na Tabela 2, é um dos fatores críticos que influenciam a aplicação industrial do leite e seus derivados, além de impactar diretamente a textura, rendimento e características sensoriais dos produtos lácteos (Mephan *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Frações das proteínas do leite em relação ao valor total (%m/m).

Fração da proteína	% da proteína
Caseína	83,85
Alfa _{s1} (α_{s1} -CN)	33,93
Alfa _{s2} (α_{s2} -CN)	8,82
Beta caseína (β -CN)	31,45
Kappa Caseína (κ -CN)	9,65
Soroproteínas	16,25
α -Lactalbumina (α -LA)	3,51
β -Lactoglobulina (β -LG)	9,1
Albumina (BSA)	1,09
Imunoglobulina ₁ (IgG1)	1,55
Imunoglobulina ₂ (IgG2)	0,22
Imunoglobulina _A (IgA)	0,27
Imunoglobulina _M (IgM)	0,24
Lactoferrina	0,27

Fonte: Lappierre *et al.* (2012).

As caseínas, que compõem a fração proteica majoritária do leite, são classificadas como fosfoproteínas devido à presença de grupos fosfato ligados aos resíduos de serina em suas cadeias polipeptídicas. Sua estrutura química é definida como um polímero de aminoácidos modificados à síntese protéica para a formação das fosfoproteínas, unidos por ligações peptídicas, resultando em longas cadeias lineares ou levemente dobradas. Essas cadeias formam subgrupos distintos, que se diferenciam por suas propriedades físico-químicas e por suas funções na formação da micela de caseína, uma estrutura altamente organizada que é essencial para a estabilidade coloidal do leite (Lappierre *et al.*, 2012).

As principais subfrações da caseína são quatro: α_{s1} -caseína (α_{s1} -CN), α_{s2} -caseína (α_{s2} -CN), β -caseína (β -CN) e κ -caseína (κ -CN). Cada uma dessas subfrações apresenta características únicas quanto à solubilidade, carga elétrica, composição de fosfato, e papel na micela e na coagulação do leite. Dentre elas, a α_{s1} -caseína é a mais abundante no leite bovino e se destaca por sua boa solubilidade em água e propriedades emulsificantes que favorecem a interação entre fases lipídicas e aquosas em sistemas alimentares. Essa característica é particularmente relevante em produtos lácteos como queijos e bebidas lácteas (Muller-Buschbaum *et al.*, 2007).

A β -caseína também se apresenta em proporção significativa, embora seja menos solúvel em meio aquoso em comparação à α_{s1} -caseína. Uma característica distintiva da

β -CN é suas variações genéticas, especialmente em relação aos alelos A1 e A2. Essas variantes influenciam a digestibilidade do leite e têm sido objeto de estudos que investigam possíveis correlações com respostas inflamatórias e desconfortos gastrointestinais em pessoas sensíveis (Jaiswal; Sarsavan, 2014).

A κ -caseína, por sua vez, desempenha um papel crucial na estabilidade da micela de caseína. Apesar de estar presente em menor proporção, sua importância funcional é significativa. Essa subfração possui grupos fosfato que interagem fortemente com íons de cálcio e forma uma espécie de “capa protetora” ao redor das micelas, impedindo sua agregação espontânea. Essa propriedade é determinante nos processos de coagulação enzimática, como na fabricação de queijos, pois a clivagem da κ -CN pelas enzimas coagulantes leva à desestabilização micelar e à formação da coalhada (González; Campos, 2003).

Os pesos moleculares das principais subfrações das caseínas são variados, refletindo sua complexidade estrutural: a α_1 -CN apresenta aproximadamente 23,6 kDa, a α_2 -CN cerca de 25,2 kDa, a β -CN em torno de 24,0 kDa, e a κ -CN cerca de 19,0 kDa (Tsabouri *et al.*, 2014). Além disso, o número de grupos fosfato presentes em cada subunidade afeta diretamente seu comportamento em diferentes faixas de pH. Essa variação influencia o ponto isoelétrico (pI) de cada proteína, o que a torna propensa à precipitação. A α_1 -CN possui entre 8 e 10 grupos fosfato/mol e pI entre 4,2 e 4,7; a α_2 -CN varia de 10 a 13 grupos fosfato/mol; a β -CN possui entre 4 e 5 grupos fosfato/mol com pI de 4,6 a 5,1; enquanto a κ -CN apresenta apenas um grupo fosfato/mol, mas um pI relativamente amplo, entre 4,1 e 5,8. A média do ponto isoelétrico da micela de caseína como um todo é de aproximadamente pH 4,6, o que explica sua desestabilização e precipitação em ambientes ácidos, como ocorre naturalmente na fermentação láctica (Josephson *et al.*, 1971; Di Luccia *et al.*, 1988).

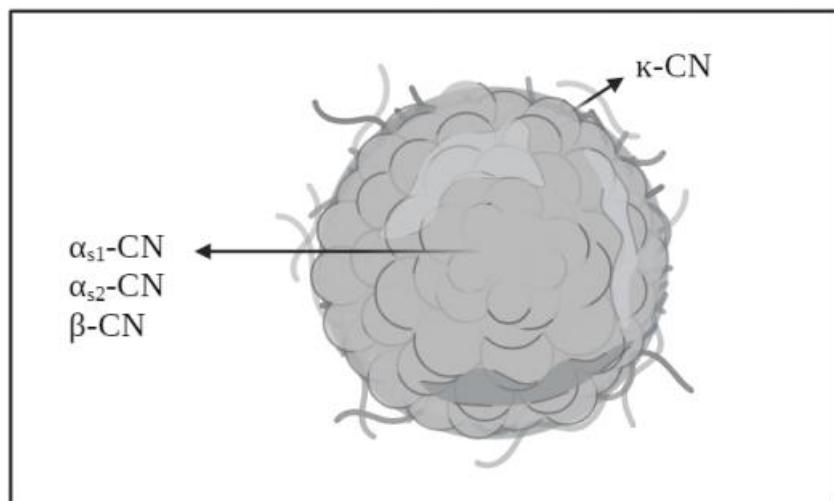
A estrutura das micelas de caseína é complexa e altamente organizada. Elas são formadas por frações menores denominadas submicelas, compostas por diferentes tipos de caseínas interligadas por pontes de fosfato de cálcio coloidal, bem como por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Essa configuração resulta em partículas micelares com diâmetro variável, podendo oscilar entre 20 a 300 nanômetros (Horne, 2006).

Do ponto de vista estrutural, as micelas apresentam uma região central predominantemente hidrofóbica, onde se concentram principalmente as frações α_1 , α_2 e β -caseínas. A periferia das micelas, por sua vez, é constituída por κ -caseína, que por conter regiões polares expostas ao meio aquoso, confere à estrutura uma camada

hidrofílica externa. Essa configuração permite que as micelas permaneçam dispersas em solução, conferindo ao leite sua aparência homogênea e coloidal. A presença dos grupos fosfato, especialmente nas regiões que envolvem a β -caseína, promove uma dobradura molecular que facilita a agregação ordenada das subunidades, garantindo a formação de uma matriz interna altamente hidratada e estável (Antonov; Moldenaers; Cardinaels, 2017; Rebouillat; Ortega-Requena, 2015).

Essa conformação estrutural exerce influência direta em importantes propriedades tecnológicas do leite. A estabilidade térmica, a resistência à coagulação, a formação de gel e a cor branca característica do leite estão todas associadas à organização tridimensional das micelas de caseína. No processamento industrial, compreender essa estrutura é essencial para otimizar processos como a pasteurização, ultrafiltração, fermentação e fabricação de queijos e iogurtes, nos quais a manipulação da estrutura micelar tem impacto direto sobre a textura, rendimento e qualidade sensorial dos produtos finais (Fox; Brodkorb, 2008; Silva *et al.*, 2019).

Figura 1 - Representação esquemática das frações proteicas que formam as micelas de caseína.



Fonte: Criado com Biorender.com (2025).

A kappa-caseína (κ -CN), localizada predominantemente na superfície externa das micelas de caseína é altamente hidratada e forma uma espécie de “capa protetora” ao redor da micela, composta por filamentos com cargas negativas. Essas cargas promovem repulsão eletrostática entre as micelas, evitando sua aglomeração e assegurando a

estabilidade física da dispersão coloidal do leite durante o armazenamento e o processamento (Varnam; Sutherland, 1995).

Do ponto de vista composicional, as micelas de caseína são predominantemente constituídas por proteínas (aproximadamente 91%), mas também incluem minerais como cálcio e fósforo, tanto em formas orgânicas quanto inorgânicas. Pequenas quantidades de outros íons, como magnésio, sódio e potássio, também fazem parte dessa estrutura. Essa composição reforça não apenas o valor nutricional do leite, mas também suas propriedades tecnológicas, sendo fundamental para produtos fermentados e queijos (Sgarbieri, 1996).

Além de seu papel funcional no leite fluido, as caseínas se destacam como matérias-primas fundamentais na fabricação de uma variedade de produtos lácteos, especialmente queijos. Sua estrutura permite interações com enzimas coagulantes e íons cálcio, facilitando a formação do coágulo durante o processo de coagulação. As micelas são especialmente ricas em aminoácidos de cadeia ramificada, como leucina, isoleucina e valina, o que também contribui para seu valor nutricional elevado (Mezzamo, 2023).

As proteínas do soro diferem das caseínas principalmente por sua estrutura tridimensional mais compacta e globular. Essa característica as torna mais solúveis em água e também mais susceptíveis a alterações térmicas. Apesar de não apresentarem grupos fosfato ligados, como ocorre nas caseínas, elas possuem alto conteúdo de aminoácidos sulfurados, o que as torna nutricionalmente relevantes, especialmente em dietas com foco em fortalecimento muscular e imunidade (Fonseca; Santos, 2007).

A β -LG é a proteína majoritária do soro no leite bovino, correspondendo a cerca de metade das proteínas dessa fração e aproximadamente 12% da proteína total do leite. Sua estrutura é sensível a mudanças de pH, concentração de íons e outros constituintes do meio, o que influencia diretamente sua estabilidade térmica durante o processamento industrial (Fox; McSweeney, 1998; Kontopidis *et al.*, 2004).

Já a α -LA, segunda em abundância entre as proteínas do soro, representa cerca de 20% dessa fração. Ela está diretamente envolvida na biossíntese da lactose e participa do complexo enzimático responsável por esse processo. Sua presença é fundamental para a regulação da secreção de leite na glândula mamária (Harding, 1995; Velickovic *et al.*, 2018).

As imunoglobulinas, embora presentes em menor quantidade no leite, desempenham papel essencial na imunidade passiva, especialmente no colostro. A imunoglobulina G (IgG), em particular, é a mais abundante entre elas, permanecendo no

leite após a fase colostral e contribuindo para a defesa imunológica do recém-nascido (Knight *et al.*, 1994).

A albumina sérica, derivada do plasma sanguíneo, também é transportada para o leite via glândula mamária, apresentando uma massa molecular significativamente maior em comparação com as demais proteínas do leite (Larson, 1985). A lactoferrina, por sua vez, é uma glicoproteína multifuncional que atua como agente antimicrobiano, antioxidante e imunomodulador, além de facilitar a absorção de ferro no trato gastrointestinal (Steijns; Hooijdonk, 2000; Krissansen, 2007).

3.1.2 Composição salina do leite

Os minerais presentes no leite exercem funções essenciais tanto sob a ótica nutricional quanto tecnológica. Eles influenciam diretamente na estabilidade física-química da matriz láctea, no sabor característico do produto, bem como na eficiência dos processos de beneficiamento e industrialização, especialmente na fabricação de queijos, iogurtes e outros derivados. Diversos fatores podem interferir na concentração e distribuição desses minerais no leite, como o estágio fisiológico do animal, o tipo de alimentação fornecida e o período da lactação (Cobo-Angel *et al.*, 2014). A Tabela 3 apresenta as faixas de concentração dos principais minerais encontrados no leite de vaca.

Tabela 3 - Composição salina do leite de vaca.

Mineral	Concentração ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Concentração ($\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Cálcio (Ca^{2+})	1043-1283	26-32
Magnésio (Mg^{2+})	97-146	4-6
Fosfato inorgânico (PO_4^{3-})	1805-2185	19-23
Fósforo total (P)	930-992	30-32
Citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$)	1323-2079	7-11
Sódio (Na^+)	391-644	17-28
Potássio (K^+)	1212-1681	31-43
Cloreto (Cl^-)	772-1207	22-34

Fonte: Adaptado de (Gaucheron, 2005).

Entre os minerais predominantes no leite bovino, destacam-se os cátions cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+), além dos ânions fosfato (PO_4^{3-}),

citrato ($C_6H_5O_7^{3-}$) e cloreto (Cl^-). Esses íons estão distribuídos em duas fases distintas: a coloidal, que está associada às micelas de caseína, e a fase solúvel, dispersa na porção aquosa do leite. Enquanto os íons como sódio, potássio e cloreto se encontram predominantemente na fase solúvel, o cálcio, magnésio e fosfato apresentam uma participação significativa tanto na fase coloidal quanto na fase solúvel, formando estruturas complexas, como o fosfato de cálcio coloidal (Gaucheron, 2005; Fox & McSweeney, 1998).

Estudos mostram que cerca de um terço do cálcio total, metade do fosfato inorgânico e dois terços do magnésio estão associados à fase coloidal, enquanto mais de 90% do citrato está solúvel na fase aquosa (Gaucheron, 2005). Essa distribuição influencia diretamente nas propriedades físico-químicas do leite, como o efeito tampão, um mecanismo essencial que permite ao leite resistir a variações de pH, mantendo-o em torno de 6,6 (Hurley, 1999).

Do ponto de vista nutricional, o leite é amplamente reconhecido como uma das melhores fontes alimentares de cálcio biodisponível, um mineral fundamental para o desenvolvimento e a manutenção da densidade óssea, integridade dental, contração muscular e em funções enzimáticas. Grande parte desse cálcio encontra-se complexado na estrutura das micelas de caseína, associada ao fósforo, sob a forma de fosfato de cálcio coloidal. Essa ligação é dinamicamente influenciada por fatores como temperatura, pH e concentração de íons livres, podendo provocar uma redistribuição entre as fases coloidal e solúvel (Tsioupas, Lewis & Grandison, 2007; Melo, 2022).

O cálcio, assim como outros minerais presentes no leite, é originado do plasma sanguíneo do animal, sendo transferido para o leite por meio de processos fisiológicos específicos. As interações químicas que ocorrem entre o cálcio e as proteínas, especialmente a caseína, ajudam a manter o equilíbrio osmótico entre o leite e o sangue (Schmidt, 1974; Larson *et al.*, 1978).

A nutrição animal também exerce papel crucial na composição mineral do leite. Desequilíbrios nutricionais podem comprometer a estabilidade da micela de caseína e, consequentemente, afetar negativamente a qualidade tecnológica do leite (Barros, 2001). A relação entre cálcio e fósforo é especialmente importante na formação e manutenção da estrutura micelar, impactando diretamente nos processos industriais de coagulação e aquecimento. O equilíbrio entre os minerais presentes nas diferentes fases (coloidal, solúvel e como íons livres) é um fator determinante para a estabilidade físico-química do leite durante o armazenamento e no processamento (Lin, Lewis & Grandison, 2006).

Além disso, concentrações elevadas de íons como cloreto, sódio, potássio e cálcio podem alterar a constante dielétrica do meio, diminuindo a força de repulsão entre as micelas de caseína e favorecendo reações de instabilidade, como a coagulação espontânea, o que compromete o rendimento e a qualidade dos produtos lácteos (Chavez *et al.*, 2004).

3.2 COAGULAÇÃO

A estabilidade coloidal do leite é garantida principalmente pela estrutura organizada das micelas de caseína, que mantêm as proteínas em suspensão na fase aquosa. Quando essa estrutura micelar é desestabilizada, ocorre a precipitação das caseínas, originando uma matriz proteica semi-sólida denominada coalhada (González; Durr; Fontanelli, 2001).

O processo de coagulação do leite consiste em uma transformação físico-química em que as micelas de caseína perdem sua estabilidade, formando agregados proteicos insolúveis que se separam da fase líquida, resultando na formação da massa coalhada e na liberação do soro. Essa coagulação pode ocorrer por dois mecanismos principais: acidificação, caracterizando a coagulação ácida, ou por ação enzimática, denominada de coagulação enzimática (Vidal; Saran Netto, 2018).

3.2.1 Coagulação Enzimática

A coagulação enzimática ocorre por meio da ação de enzimas proteolíticas, como a quimosina, que hidrolisam especificamente a ligação peptídica entre os resíduos de fenilalanina e metionina (posição 105–106) na fração κ -caseína. Essa hidrólise compromete a estabilidade superficial das micelas, reduzindo a carga elétrica negativa responsável pela repulsão eletrostática entre elas. A perda dessa repulsão favorece a aproximação das micelas, promovendo sua agregação e consequente formação da coalhada (Ordoñéz, 2005; Law, 2011; Vidal; Saran Netto, 2018).

As enzimas utilizadas nesse processo podem ser de origem animal (como o coelho tradicional), vegetal, ou microbiana, que é amplamente utilizada na fabricação de queijos. A coagulação enzimática é preferida quando se busca um gel mais firme e com melhor sinérese, sendo mais comum do que a coagulação ácida em processos industriais.

3.2.2 Coagulação Ácida

A estabilidade das micelas de caseína depende fortemente do pH do meio. Em condições normais, o leite apresenta pH entre 6,6 a 6,8. Quando o pH é reduzido para valores próximos ao ponto isoelétrico da caseína ($\text{pH} \sim 4,6$), ocorre a desestabilização das micelas e a subsequente formação da coalhada. Essa redução pode ocorrer por ação de bactérias lácticas produtoras de ácido lático ou pela adição direta de ácidos orgânicos ou inorgânicos (Singh, 2004; Vidal; Saran Netto, 2018).

Durante a acidificação, há solubilização progressiva dos sais minerais presentes nas micelas, especialmente o cálcio e o fosfato, promovendo a desmineralização das caseínas e facilitando sua precipitação. O cálcio iônico, por sua vez, exerce um papel relevante nesse equilíbrio. Concentrações elevadas de cálcio livre reduzem as cargas negativas das micelas, diminuindo a barreira energética que impede a agregação proteica. Assim, há uma relação inversa entre o teor de cálcio iônico e a estabilidade da fase coloidal do leite (Horne; Parker, 1981; Chavez, 2004).

A temperatura também interfere nesse processo. O aquecimento do leite provoca associação entre proteínas do soro e caseínas, o que eleva o ponto isoelétrico das micelas. Quando acidificado, o leite aquecido tende a formar precipitados com estrutura de flocos ou grânulos, em vez do gel contínuo e uniforme típico da coagulação enzimática (Scott; Robinson; Willey, 2002).

Em condições de refrigeração, há uma redução na mobilidade molecular, resultando na dissociação parcial das submicelas e redistribuição da caseína para a fase solúvel. Por exemplo, a 20 °C, cerca de 93% a 95% da caseína está na forma micelar; a 2 °C, essa proporção pode cair para 80% a 85% (Walstra; Jenness, 2006; Mathiev, 1985). Além disso, o aquecimento severo seguido de acidificação afeta significativamente a fração κ -caseína, promovendo agregação por aumento da hidrofobicidade superficial e diminuição da repulsão eletrostática (Sgarbieri, 2005).

O ácido mais comumente utilizado na acidificação direta é o ácido lático ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), um ácido orgânico de baixa acidez ($\text{pK}_a = 3,85$), biodegradável, não tóxico e com boa capacidade de retenção de água. Ele é comercializado em soluções com concentrações entre 40% e 85% (Datta *et al.*, 1995; Vishnu; Seenayya; Reddy, 2002).

Outros ácidos também podem ser empregados, como o ácido clorídrico (HCl) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4), ambos considerados ácidos fortes. O ácido clorídrico, volátil e corrosivo, é utilizado na indústria alimentícia em grau alimentício (37%) principalmente

para ajuste de pH e hidrólise proteica (Araujo, 2023). Já o ácido sulfúrico, com pureza de até 98%, possui elevado poder oxidante e desidratante, sendo também aplicado no ajuste de pH em processos industriais (Ferreira, 2023).

A acidificação direta é vantajosa em processos industriais por reduzir custos e tempo de produção, além de oferecer maior padronização da massa obtida. Essa abordagem permite a adaptação do processo a sistemas contínuos, otimizando a eficiência produtiva (Fernandes; Martins, 1980; Van Dender, 2006).

3.2.3 Soro de Leite

O soro de leite é definido como o líquido remanescente obtido após a separação da caseína durante o processo de coagulação do leite, sendo amplamente gerado nas etapas de fabricação de queijos, caseína alimentar e outros derivados lácteos. Trata-se de um subproduto de coloração amarelo-esverdeada, opaca, e de sabor levemente ácido ou adocicado, a depender do método de coagulação empregado (Sgarbieri, 1996; Brasil, 2020).

Do ponto de vista tecnológico, o tipo de soro produzido varia de acordo com o processo de coagulação: quando o leite é coagulado por acidificação até pH 4,6, o soro gerado é denominado soro ácido; por outro lado, quando a coagulação ocorre por ação enzimática, geralmente em faixas de pH entre 5,9 a 6,3, o soro resultante é classificado como soro doce (Sgarbieri, 1996). A natureza da coagulação, bem como as condições operacionais de processamento, afeta diretamente a composição físico-química do soro e suas características sensoriais (Antunes, 2003).

A composição do soro de leite é predominantemente aquosa, com teor de umidade entre 93% a 94%. Os sólidos totais compreendem cerca de 6% a 7%, sendo constituídos, principalmente, por lactose (4,5% – 5,0%), proteínas solúveis (0,8% – 1,0%), lipídios (0,3% – 0,5%), sais minerais (0,6% – 1,0%) e pequenas quantidades de vitaminas hidrossolúveis. Dentre os minerais, destacam-se os teores médios de sódio (313 – 493 mg·L⁻¹), fósforo (237,1 – 275,0 mg·L⁻¹), cálcio (231,6 – 384,8 mg·L⁻¹), magnésio (54,4 – 73,0 mg·L⁻¹) e potássio (1055 – 1535 mg·L⁻¹), além de vestígios de outros elementos traço (Carvalho, 2013; Rasanen *et al.*, 2002; Supárez *et al.*, 2006).

O tipo de soro influencia significativamente sua composição (Tabela 4). No soro ácido, observa-se uma menor concentração de lactose, em virtude da conversão desse carboidrato em ácido láctico pelas bactérias fermentadoras por meio desse processo de

obtenção de massa coagulada por coagulação ácida. Em contrapartida, esse tipo de soro apresenta concentrações mais elevadas de cálcio e fósforo, decorrentes da solubilização do fosfato de cálcio micelar sob pH ácido. O soro doce, por sua vez, apresenta maior conteúdo de peptídeos e aminoácidos livres, resultantes da ação proteolítica sobre as micelas de caseína durante a coagulação enzimática (Sgarbieri, 1996; Rodrigues, 2001).

Tabela 4 - Classificação do soro de acordo com a obtenção e processos tecnológicos empregados.

Grupos	Classificação
De acordo com a acidez	Soro de Leite Doce; Soro de Leite Ácido ou Soro Ácido.
De acordo com o tratamento térmico	Soro de Leite Resfriado ou Soro de Leite Pasteurizado.
De acordo com a concentração	Soro de Leite Líquido; Soro de Leite Concentrado ou Parcialmente Desidratado; Soro de Leite em Pó; Soro de Leite Permeado ou Permeado de Soro de Leite; Soro de Leite Permeado em Pó ou Permeado de Soro em Pó.
De acordo com o teor de sais minerais	Soro de Leite; Soro de Leite Parcialmente Desmineralizado; Soro de Leite Desmineralizado ou Soro de Leite Totalmente Desmineralizado.

Fonte: Adaptado de Antunes (2003); Brasil (2020).

Durante muitos anos, o soro de leite foi considerado um resíduo industrial de baixo valor agregado, frequentemente descartado, devido ao seu elevado volume e à dificuldade de armazenamento e destinação adequada. Estima-se que para cada quilograma de queijo produzido, são gerados aproximadamente 9 quilogramas de soro de leite (Robbins *et al.*, 1996). No entanto, com os avanços na tecnologia de processamento, como os métodos de separação por membranas, especialmente a ultrafiltração, e técnicas de secagem para obtenção do soro em pó, esse subproduto passou a ser amplamente valorizado pela indústria alimentícia (Supárez *et al.*, 2006; Khalesi *et al.*, 2023).

Atualmente, o soro de leite é utilizado como ingrediente funcional em diversas formulações, como bebidas lácteas, suplementos proteicos, panificação, confeitoraria e nutrição infantil, além de representar uma importante fonte de compostos bioativos e proteínas de alto valor biológico. A sua valorização contribui não apenas para o aproveitamento integral da matéria-prima, mas também para a sustentabilidade dos

processos industriais, reduzindo a geração de resíduos e os impactos ambientais associados ao descarte inadequado (Kumar *et al.*, 2018)

O processo de concentração do soro de leite representa uma etapa essencial no aproveitamento tecnológico desse subproduto, pois possibilita a valorização de seus constituintes nutricionais e funcionais. A concentração dos componentes do soro, como proteínas, lactose e minerais, além de reduzir significativamente seu volume total, também contribui diretamente para a diminuição dos custos logísticos, especialmente no que diz respeito ao armazenamento e ao transporte (Maganha, 2006).

3.2.4 Massa coalhada: características e aplicações

A massa coalhada corresponde à fração sólida proteica que se forma após o processo de coagulação do leite, sendo constituída majoritariamente por caseínas precipitadas. Essa massa apresenta uma textura floculada semissólida, semelhante à de um queijo fresco, e possui um sabor que varia do levemente ácido ao suave, de acordo com o tipo de coagulação utilizado (Sgarbieri, 1996).

No caso específico da acidificação direta do leite realizada a quente, o coágulo formado tende a apresentar uma estrutura mais firme, com características de ressecamento e quebradiça. Essas propriedades físico-químicas resultam principalmente da desmineralização das micelas de caseína, promovida pela redução do pH. Para essa finalidade, é comum a utilização de leite desnatado, o qual é submetido ao aquecimento até temperaturas próximas a 70 °C para facilitar a formação do coágulo (Van Dender *et al.*, 2014). Em determinadas tecnologias de produção, essa precipitação pode ser realizada em temperaturas mais elevadas, atingindo até 85 °C. Nesses casos, observa-se que a quantidade de ácido necessária para promover a coagulação é reduzida, favorecendo a eficiência do processo (Sobral *et al.*, 2019).

A composição e a estrutura da massa coalhada desempenham um papel fundamental nas características do produto final ao qual será destinada. Para a fabricação de requeijão, por exemplo, tem-se dado preferência à massa obtida por acidificação direta, especialmente pela praticidade e vantagens econômicas que esse método oferece. A utilização da acidificação direta a quente não apenas reduz os custos e o tempo de produção do Requeijão, como também elimina a necessidade de manter culturas lácticas, favorecendo a padronização do processo (Sobral *et al.*, 2019).

Além disso, essa abordagem tecnológica possibilita uma maior uniformidade na produção em larga escala e contribui para melhorar as condições de conservação do produto final. Outro benefício associado a essa técnica é a viabilidade de automação da linha de produção, o que permite a operação contínua e mais eficiente da planta industrial (Fernandes; Martins, 1980; Van Dender, 2006).

3.3 REQUEIJÃO

O Requeijão é um produto lácteo tradicional amplamente consumido no Brasil, cuja definição oficial está estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do Requeijão ou Requesón. De acordo com essa regulamentação, o Requeijão é obtido por meio da fusão da massa coalhada, a qual pode ou não ter sido previamente cozida, dessorada e lavada. Essa massa resulta da coagulação ácida e/ou enzimática do leite, e o processo pode incluir, de forma opcional, a adição de ingredientes lácteos como creme de leite, manteiga, gordura anidra de leite ou butter oil. O regulamento também permite a adição de condimentos, especiarias e outras substâncias alimentícias legalmente autorizadas para fins de enriquecimento sensorial ou nutricional. No entanto, a denominação "Requeijão" está estritamente reservada aos produtos cuja base láctea não contenha gordura ou proteína de origem não láctea, a fim de preservar a identidade e a autenticidade do produto (Brasil, 1997).

No território brasileiro, os tipos de requeijão disponíveis no mercado apresentam ampla variedade em termos de textura e consistência. Essa diversidade inclui desde produtos com consistência untável, de fácil espalhabilidade, até aqueles com estrutura mais firme e coesa, que permitem o corte em fatias (Oliveira, 1986). Segundo o RTIQ de 1997, os requeijões são oficialmente classificados em três categorias principais: Requeijão, Requeijão Cremoso e Requeijão Tipo Manteiga. Essa classificação leva em consideração fatores como a natureza das matérias-primas utilizadas, o tipo de sal fundente empregado no processo industrial e as concentrações finais de gordura e umidade no produto acabado (Brasil, 1997).

Tabela 5 - Requisitos físico-químicos para os diferentes Requeijões.

Requisito	Requeijão	Requeijão Cremoso	Requeijão de Manteiga	Métodos de Análises
Matéria gorda no extrato seco g/100g	45,0 a 54,9	Mín. 55,0	Mín. 25,0 a 59,9	Norma FIL 5B: 1986
Umidade g/100g	Máx. 60,0	Máx. 65,0	Máx. 58,0	Norma FIL 4A: 1982

Fonte: Adaptado de Brasil, 1997.

Além dessas categorias principais, há ainda subvariedades comerciais, como o Requeijão em barra e o Requeijão culinário. Esses diferentes formatos e aplicações devem, contudo, enquadrar-se nas exigências legais estabelecidas para a composição e identidade do produto (Fernandes *et al.*, 1985).

A elaboração do Requeijão consiste essencialmente na fusão das proteínas presentes na massa coalhada com a gordura láctea, incorporando-se água de maneira controlada para atingir a umidade final desejada no produto. Esse processo ocorre sob condições específicas de calor e agitação mecânica contínua, utilizando-se equipamentos industriais adequados ao processamento de queijos fundidos (Van Dender, 2014). No contexto dos queijos processados, o sucesso da fusão dos ingredientes depende de uma série de parâmetros tecnológicos, incluindo o equilíbrio iônico da massa, a temperatura de fusão aplicada, o tempo e a intensidade da agitação e a dosagem correta dos sais fundentes empregados (Rapacci, 1997).

Os sais fundentes, por sua vez, desempenham um papel fundamental na definição da textura, fluidez e palatabilidade do Requeijão. Sua principal função tecnológica é sequestrar os íons de cálcio presentes nas micelas de caseína, promovendo sua substituição por outros íons, sendo mais comum o de sódio. Esse processo provoca uma reorganização estrutural da matriz proteica, favorecendo a formação de uma massa mais fluida e homogênea. Portanto, o pH da massa coalhada no momento da fusão, assim como o grau de desmineralização decorrente da adição dos sais fundentes, são fatores críticos para alcançar a textura cremosa e a consistência adequada do produto final (Van Dender, 2014; Mozuraityte *et al.*, 2019). Entre os sais mais comumente utilizados nesse processo, destacam-se o citrato de sódio e o fosfato de sódio e suas variações, devido à sua eficiência funcional e à aceitação regulatória e sensorial (Lucey *et al.*, 2011).

Em termos sensoriais e físicos, o Requeijão deve apresentar características específicas de acordo com as normas estabelecidas: consistência untável ou fatiável, textura cremosa, fina, lisa ou levemente compacta, coloração característica, odor agradável típico do creme de leite, sabor levemente ácido e, eventualmente, com adição de sal (Brasil, 1997). Atualmente, o Requeijão ocupa a terceira posição entre os queijos mais consumidos em território nacional, ficando atrás apenas da Mussarela e do Queijo Prato (ABIQ, 2019).

Esse aumento significativo no consumo de Requeijão pode ser atribuído à sua ampla aplicação na culinária brasileira, especialmente na preparação de lanches, sanduíches, pratos quentes e receitas diversas. Além disso, sua produção em escala industrial e a vasta distribuição em diferentes formatos e marcas em todo o país contribuem diretamente para sua popularização e acessibilidade entre os consumidores (Bastos *et al.*, 2013; Daxia, 2022).

3.4 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA

A Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) constitui uma técnica analítica instrumental amplamente empregada na caracterização elementar de materiais. Sua aplicação visa à identificação qualitativa e à quantificação semi-quantitativa dos elementos químicos presentes em uma determinada amostra. Essa metodologia baseia-se no princípio da interação de um feixe de elétrons de alta energia, geralmente produzido em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), com os átomos localizados na superfície ou em regiões superficiais do material em análise (Murrieta-Pazos *et al.*, 2012).

A interação do feixe eletrônico com a amostra resulta na ionização das camadas eletrônicas internas dos átomos, particularmente da camada K ou L, ocasionando a transição de elétrons de níveis mais externos para níveis mais internos. Esse rearranjo energético provoca a emissão de radiação na forma de raios X, cuja energia é característica e exclusiva de cada elemento químico, funcionando, portanto, como uma "impressão digital" atômica (Siegbahn *et al.*, 1967; Vieira *et al.*, 2021).

A natureza específica das energias emitidas permite não apenas a identificação dos elementos presentes, mas também uma estimativa de sua concentração relativa na amostra. A técnica é particularmente eficaz na análise de sólidos e materiais de origem inorgânica, tendo sido amplamente aplicada em áreas como ciência dos materiais, geologia, metalurgia, arqueometria, forense e engenharia. Em virtude de sua alta

sensibilidade, resolução espacial microscópica e tempo de resposta relativamente curto, a EDS tem sido utilizada de forma crescente como ferramenta complementar a outras técnicas de microscopia eletrônica e espectroscopia (Murrieta-Pazos *et al.*, 2013).

A técnica de EDS oferece rapidez, podendo em poucos segundos, produzir um espectro de raio-X que varia de zero a muitas dezenas de quilo elétron-volts (keV), e poderá produzir esse espectro de uma amostra de tamanho mícron, que teve apenas uma mínima preparação (Severin, 2004). Além disso, quando comparado com a técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS), o EDS, ao contrário desse, permite uma caracterização da superfície em um nível mais profundo, desde o primeiro mícron até os cinco primeiros mícrons (Kursula, 2000).

Além disso, o EDS permite uma caracterização muito localizada na partícula, enquanto que a área de análise do XPS é maior (300 x 700m) (Murrieta-Pazos *et al.*, 2012; Murrieta-Pazos *et al.*, 2013). Em contraste, existem limitações a este método, dentre as quais deve-se incluir sua baixa sensibilidade a oligoelementos e elementos mais leves que o Na. Além disso, a perda de elementos voláteis (Na) durante a excitação é um fenômeno bem conhecido (Kursula, 2000; Materials Evaluation and Engineering, Inc., 2016).

Estudos recentes conduzidos por Vieira (2021) e Paula (2021) evidenciaram o potencial promissor da espectroscopia de energia dispersiva de raios X, especialmente quando acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), para aplicações no setor de alimentos, mais especificamente na indústria de laticínios. Os autores demonstraram que o uso dessa técnica permite uma avaliação rápida, eficiente e não destrutiva da composição mineral de produtos lácteos, representando uma alternativa viável às metodologias tradicionais de análise elementar, que muitas vezes são mais demoradas, onerosas e exigem maior preparo de amostras. Ainda que o uso da EDS nessa área específica seja relativamente recente e pouco explorado, os resultados iniciais indicam um grande potencial de aplicação no controle de qualidade, rastreabilidade de matérias-primas e investigação de alterações físico-químicas durante o processamento dos alimentos.

4 METODOLOGIA

A seguir será apresentada a metodologia utilizada para a realização desse trabalho. Dentre as etapas estão: o preparo das amostras, a descrição das análises propostas e o tratamento estatístico dado aos resultados.

4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo das amostras teve como ponto de partida o uso de leite em pó desnatado, caracterizado por ter sido submetido a um tratamento térmico brando (low heat). A composição físico-química do leite em pó utilizado incluía os seguintes parâmetros: teor de gordura igual a 0,74%, umidade de 3,28% e conteúdo proteico correspondente a 38,63%. Para a obtenção da matriz líquida, o leite em pó foi reconstituído por meio da adição de água deionizada, de modo a se alcançar uma concentração final de 9% em massa de sólidos totais (m/m), o que proporcionou uma base uniforme para os procedimentos subsequentes.

Após a reconstituição, o leite foi armazenado sob refrigeração à temperatura de 5 °C durante um período de 24 horas, garantindo a estabilização da solução. Em seguida, deu-se início ao processo de acidificação do leite, mantendo a temperatura constante em 5 °C e sob agitação contínua. Essa acidificação foi realizada mediante a adição controlada dos ácidos láctico (85% m/v), ácido clorídrico (37% m/v) e ácido sulfúrico (98% m/v). O processo foi conduzido até que fossem atingidos os valores de pH de 4,55; 4,70; 4,85 e 5,00.

A partir da solução acidificada, foi promovida a coagulação do leite, iniciada por um aumento gradual da temperatura, partindo de 5 °C até atingir o valor final de 55 °C. Durante essa etapa, foram registrados o ponto inicial de coagulação (em termos de tempo e temperatura) e o tempo necessário para que a temperatura final de 55 °C fosse alcançada. A formação do aglomerado proteico, também conhecido como massa coalhada, ocorreu ao longo desse processo térmico.

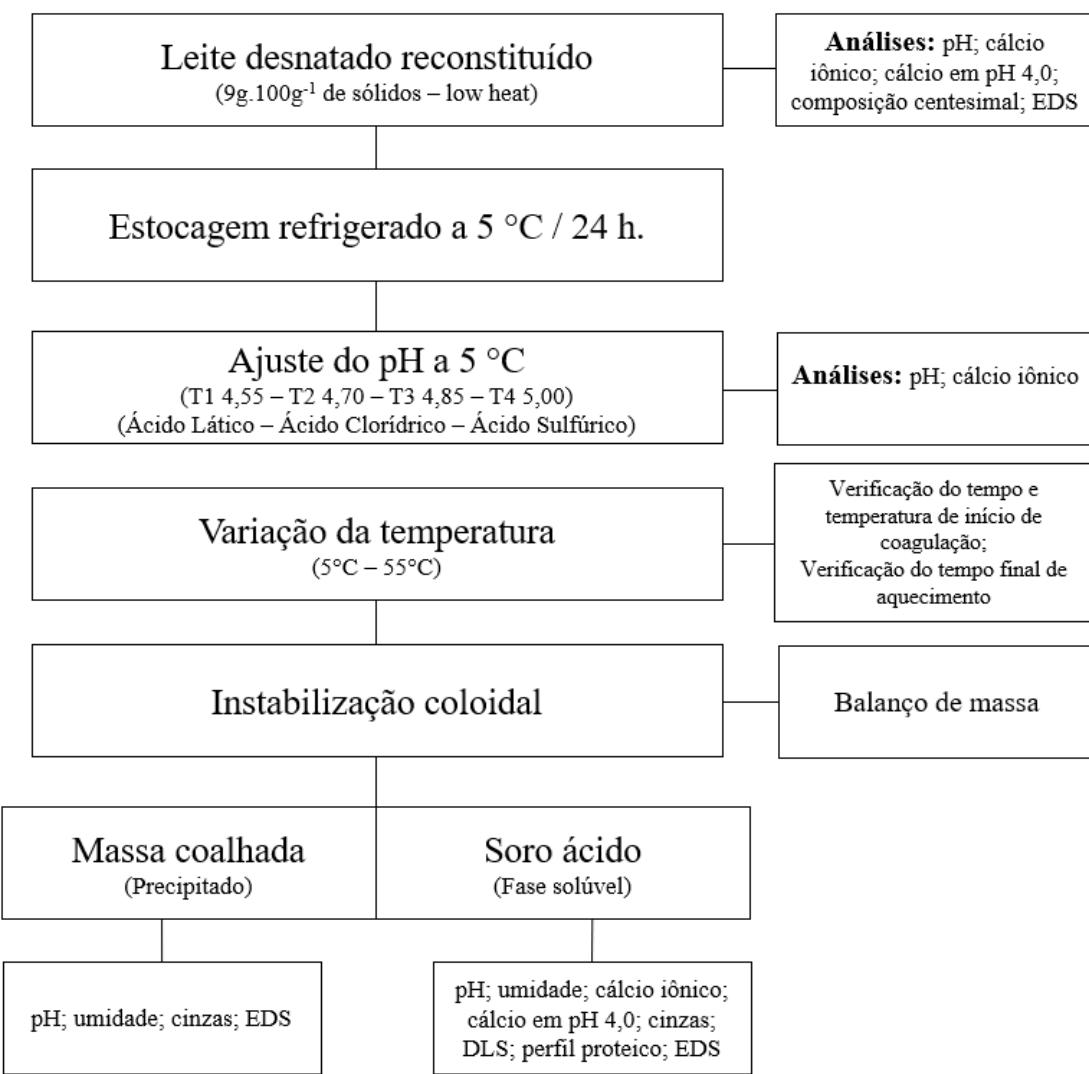
Figura 2 - Equipamento adaptado para alterações de temperatura com cubar com agitação individual.



Uma vez formado o coágulo, procedeu-se à etapa de separação da fase líquida. Para isso, o material proteico precipitado foi submetido à drenagem utilizando-se um pano dessorador acoplado a um sistema de filtração a vácuo. Essa operação de dessoragem foi padronizada com duração fixa de 90 segundos, assegurando a separação eficiente do soro (fase solúvel permeada) da fração sólida (massa coalhada) de forma igual para todos os tratamentos.

Todas as amostras obtidas por esse procedimento experimental foram então submetidas às análises descritas na seção 4.2. Ressalta-se que todas as análises foram realizadas em duplicata, garantindo a confiabilidade dos dados obtidos. O delineamento experimental empregado neste estudo encontra-se resumido de forma esquemática na Figura 4, a qual apresenta visualmente as etapas metodológicas seguidas.

Figura 3 - Delineamento experimental (n=3).



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

4.2 ANÁLISES

Nas sessões a seguir são descritas as análises citadas na Figura 3, realizadas em cada uma das amostras (leite, massa coalhada e soro) do experimento.

4.2.1 Análises Físico-Químicas do Leite

As amostras de leite reconstituído foram submetidas a uma série de análises físico-químicas com o objetivo de caracterizar sua composição e propriedades fundamentais. Os parâmetros analisados incluíram os teores de gordura, proteína total, lactose, extrato seco desengordurado (ESD) e densidade. Essas determinações foram realizadas por meio do analisador automático de leite Ekomilk Cap-Lab® (Cap-Lab, Brasil), equipamento

que opera com base em princípios de espectroscopia e condutividade para avaliação rápida e precisa da composição do leite.

A mensuração do potencial hidrogeniônico (pH) das amostras de leite, massa coalhada e soro foi efetuada à temperatura ambiente, mantida em 21 ± 2 °C, utilizando-se um medidor de pH modelo PG1400 (Gehaka, Brasil). Antes das medições, o equipamento foi devidamente calibrado utilizando soluções padrão de pH 4,0 e 7,0, assegurando a confiabilidade dos valores obtidos. A calibração rigorosa é essencial para garantir a exatidão dos resultados, especialmente em matrizes complexas como o leite.

As concentrações de cálcio iônico, tanto em sua forma natural presente no leite reconstituído quanto após as acidificações, foram determinadas utilizando-se um eletrodo íon seletivo portátil para cálcio, modelo LAQUAtwin (Horiba Instruments, Japão). O método de análise seguiu a descrição proposta por Singh *et al.* (2019), que valida o uso dessa tecnologia para sistemas lácteos. O eletrodo foi previamente calibrado antes de cada ensaio experimental, utilizando soluções padrão de cálcio nas concentrações de 3,74 mM (equivalente a 150 ppm) e 49,90 mM (equivalente a 2000 ppm), de modo a garantir a linearidade da leitura em uma faixa ampla de concentração.

Para a leitura do cálcio iônico nas amostras de leite, uma alíquota representativa foi aplicada diretamente sobre o sensor do equipamento.

4.2.2 Monitoramento do Processo de Coagulação

Durante a etapa de coagulação, procedeu-se ao monitoramento da formação do precipitado proteico por meio de observação visual sistemática. O processo envolveu a elevação controlada da temperatura da amostra, iniciando-se em 5 °C até atingir 55 °C. Ao longo desse gradiente térmico, foram registrados dois parâmetros críticos: a temperatura e o tempo correspondentes ao início da coagulação, identificados visualmente pela formação de grumos ou agregados proteicos visíveis em um bastão de vidro, e o tempo total necessário para atingir a temperatura final de 55 °C. Tal abordagem permite a avaliação indireta da estabilidade térmica das proteínas presentes, bem como a cinética do processo de precipitação sob condições controladas.

4.2.3 Cálculo de Balanço de Massa e Rendimento Ajustado

Foi realizado o cálculo do balanço de massa com base no volume inicial da matéria-prima utilizada, que consistiu em 750 mL de leite reconstituído. A análise

envolveu a determinação percentual das frações geradas: massa coalhada (produto sólido), soro de leite (fase líquida residual) e eventuais perdas associadas ao processo de separação.

O rendimento ajustado da massa coalhada (RAJ) foi calculado com base na umidade teórica desejada para o produto final, estabelecida em 73%. Esse valor foi utilizado como referência nas equações 1 e 2, que permitem a normalização do rendimento de acordo com diferentes teores de umidade, possibilitando comparações equitativas entre distintos ensaios ou condições experimentais. Essa abordagem é fundamental para avaliar a eficiência tecnológica do processo de coagulação e a qualidade do produto obtido.

$$\text{Rendimento} (\%) \cdot \left(\frac{\text{Kg de queijo}}{100 \text{ Kg de leite}} \right) = \frac{\text{massa coalhada}}{\text{massa de leite utilizada}} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Rendimento ajustado} (\%) = \frac{\text{rendimento} \times (100\% - \text{umidade real})}{(100\% - \text{umidade desejada})} \quad \text{Equação 2}$$

4.2.4 Análises Físico-Químicas das Massas Coalhada

As amostras da massa coalhada obtida após o processo de coagulação do leite foram submetidas a avaliações físico-químicas com o objetivo de caracterizar suas propriedades. A medição do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada à temperatura ambiente, padronizada em 21 ± 2 °C, utilizando um medidor de pH modelo PG1400 (Gehaka, Brasil). Para assegurar a precisão e a confiabilidade das medições, o equipamento foi calibrado previamente com soluções tampão padrão de pH 4,0 e 7,0.

A determinação do teor de umidade da massa coalhada, expressa em porcentagem massa/massa (% m/m), foi conduzida pelo método gravimétrico utilizando uma balança de secagem por infravermelho, modelo MA150® (Sartorius, Alemanha). As análises foram realizadas a uma temperatura de secagem de 145 °C, em modo automático, conforme descrito por Marques e Duarte (2015). Esse procedimento permite a quantificação da fração volátil (água) por perda de massa, sendo amplamente empregado na caracterização de produtos lácteos devido à sua exatidão e reproduzibilidade.

4.2.5 Análises Físico-Químicas dos Soros

As amostras de soro obtidas após a separação da massa coalhada foram igualmente analisadas quanto às suas propriedades físico-químicas. O pH das amostras foi medido em temperatura ambiente ($21 \pm 2 ^\circ\text{C}$), utilizando o medidor de pH PG1400 (Gehaka), devidamente calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0, garantindo a confiabilidade dos dados obtidos.

O teor de umidade do soro, também expresso em % m/m, foi avaliado por meio do método gravimétrico, utilizando uma balança de infravermelho com secagem automática a $145 ^\circ\text{C}$, conforme o protocolo de Marques e Duarte (2015). Esse método é adequado para líquidos com alto teor de água, como o soro de leite.

As concentrações de cálcio iônico, tanto no pH original do soro quanto após a acidificação para pH 4,0, foram determinadas por meio de eletrodo íon seletivo portátil para cálcio LAQUAtwin (Horiba Instruments), utilizando a mesma metodologia previamente descrita no item 4.2.2. A técnica permite a quantificação direta da fração livre de cálcio, que desempenha papel crucial na estabilidade coloidal das proteínas do soro.

Para a determinação de cálcio iônico em pH 4,0, as amostras foram previamente acidificadas com solução de ácido clorídrico PA (P.A., Synth, Brasil), e uma alíquota foi então aplicada no sensor para medição. O processo de acidificação das amostras de soro até o pH 4,0 tem o objetivo de dissociar todo o cálcio coloidal para a fase iônica, permitindo sua determinação como cálcio total da amostra. Todas as amostras destinadas à análise de cálcio foram previamente resfriadas e mantidas a uma temperatura padronizada de $5 ^\circ\text{C}$, de forma a minimizar variações relacionadas ao efeito térmico sobre a atividade iônica.

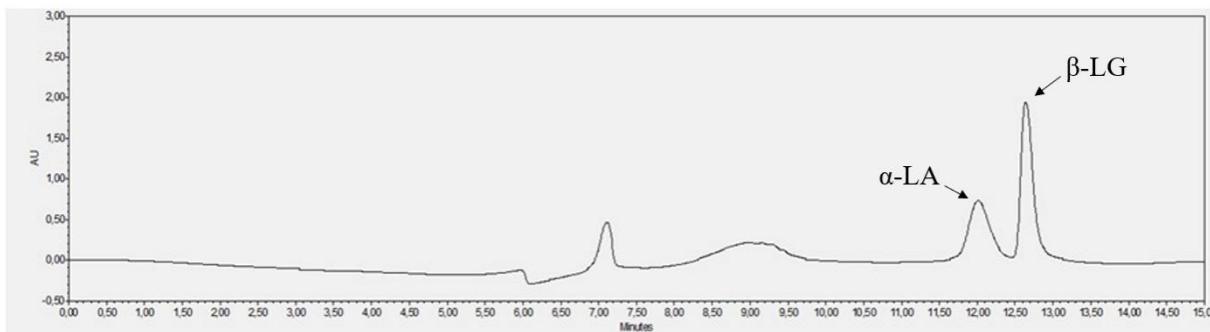
A análise do tamanho médio das partículas presentes no soro foi realizada por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments). As amostras foram transferidas para cubetas apropriadas e analisadas diretamente no equipamento, com o índice de refração do meio dispersante (água) ajustado para 1,332. Para avaliar possíveis alterações no perfil de dispersão coloidal, foram analisadas tanto amostras originais quanto amostras submetidas à centrifugação, realizada em centrífuga da marca Nova Instruments® a 2000 RPM, mantidas à temperatura ambiente ($21 \pm 2 ^\circ\text{C}$).

4.2.5.1 Caracterização do Perfil Proteico dos Soros

A análise de caracterização do perfil proteico dos soros foi realizada com o objetivo de caracterizar o perfil proteico das amostras, particularmente no que se refere à presença e concentração das principais proteínas do soro lácteo: α -lactoalbumina (α -LA) e β -lactoglobulina (β -LG). Para a determinação, foram empregadas duas técnicas analíticas complementares: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).

A análise por HPLC foi conduzida em sistema de fase reversa, utilizando um cromatógrafo líquido da marca Waters, modelo 1525, equipado com bomba binária e detector de arranjo de fotodiodos (DAD – *Photodiode Array Detector*). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Phenomenex Luna C18, com partícula de 5 μm , dimensões de 250 mm \times 4,6 mm e porosidade de 100 Å. A coluna foi mantida termicamente controlada a 40 °C durante toda a corrida cromatográfica. O volume de injeção foi de 20 μL , e a detecção das proteínas α -LA e β -LG foi realizada no comprimento de onda de 214 nm, adequado para a detecção de ligações peptídicas. A Figura 4 apresenta o cromatograma representativo obtido a partir da análise dos padrões comerciais de α -LA e β -LG fornecidos pela Sigma-Aldrich®.

Figura 4 - Cromatogramas dos padrões de α -LA e β -LG determinados em HPLC.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A eluição gradiente foi realizada com uma mistura de dois solventes a uma taxa de fluxo de 0,5 mL·min⁻¹. A fase móvel consistia em 0,1% de TFA em água ultrapura (solvente A) e 0,09% de TFA em 90% de Acetonitrila e 10% de água ultrapura (solvente B). Um programa de gradiente linear foi utilizado segundo Tabela 6.

Tabela 6 - Modo de eluição gradiente aplicado para determinação das frações proteicas α-LA e β-LG.

Tempo (min)	Fluxo (mL.min ⁻¹)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	0,5	80	20
3	0,5	60	40
5	0,5	55	45
7	0,5	50	50
9	0,5	20	80
14	0,5	80	20
15	0,5	80	20

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE) para avaliar a distribuição do peso molecular das proteínas presentes nas amostras. Foi utilizado a célula Mini Protean da marca BIORAD para a corrida eletroforética (100 V), onde o gel de separação foi de 15% e o gel de empilhamento de 4%. Foi utilizado um padrão de proteínas de 11 kDa a 245 KDa e, posteriormente os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue G 250.

4.2.6 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral das amostras de leite, massa coalhada e soro

O teor percentual de resíduo mineral fixo (RMF) foi medido através da incineração das amostras em forno mufla QUIMS® à 550 °C até obtenção das cinzas. O RMF foi calculado através da equação 3 (BRASIL, 2014).

$$\text{Resíduo mineral fixo (\% m/m)} = \frac{(m_2 - m_1)}{(m_0)} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Sendo:

m_2 : massa do cadinho após a incineração;

m_1 : massa do cadinho de porcelana;

m_0 : massa de amostra pesada.

A caracterização mineral das amostras foi medida pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X (MEV/EDS). Inicialmente realizou-se o preparo de uma pastilha com aproximadamente 0,5 g de cinzas das amostras. As cinzas foram comprimidas por pressão de aproximadamente 10 toneladas por 5 minutos em um Pastilhador (Specac 13 mm). Em seguida as pastilhas foram analisadas no MEV (TM3030PlusR, Hitachi) acoplado em um

EDS. Foram realizadas 5 medições, sendo quatro delas nas extremidades da pastilha e outra no centro. Com os dados coletados foi possível calcular a concentração em g.100g⁻¹ e mM de cada mineral obtido pela análise utilizando a equação 4 e 5 (Paula *et al.*, 2021).

$$\text{Mineral} \left(\% \frac{g}{100 \text{ g}} \right) = \% \text{massa} \times \frac{\text{Resíduo mineral fixo}}{100} \quad \text{Equação 4}$$

Sendo:

Mineral (% m/m): Concentração (% m/m) do mineral em questão.

%massa: valor obtido na análise;

$$\text{Mineral (mM)} = \text{Mineral} \left(\% \frac{g}{100 \text{ g}} \right) \times \frac{10000}{MM} \quad \text{Equação 5}$$

Sendo:

Mineral (Mm) = Concentração do mineral em questão em mM;

Mineral (% m/m) = Concentração (% m/m) do mineral em questão.

4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

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

5 RESULTADOS

Nas subseções a seguir, serão apresentados de forma detalhada os resultados obtidos a partir das diversas análises realizadas ao longo do estudo. Cada conjunto de dados foi analisado e, posteriormente, discutido com base em informações e conceitos previamente estabelecidos pela literatura científica especializada, a fim de assegurar a fundamentação teórica dos achados experimentais.

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

A Tabela 7 apresenta os valores médios referentes à caracterização físico-química dos leites reconstituídos que foram empregados na produção das massas coalhadas. Esses dados foram obtidos a partir de análises laboratoriais padronizadas e representam parâmetros fundamentais para a compreensão do comportamento do leite durante o processamento. A avaliação dessas características físico-químicas é essencial para assegurar a qualidade da matéria-prima, além de permitir a correlação com o desempenho tecnológico durante a fabricação e com as propriedades finais dos produtos obtidos.

Tabela 7 - Caracterização físico-química do leite reconstituído utilizado nas fabricações das massas coalhada*

Análises	Resultados
Umidade (g/100g)	91,34 ± 0,13
Gordura (g/100g)	0,24 ± 0,00
ESD** (g/100g)	8,42 ± 0,13
Proteína (g/100g)	3,22 ± 0,05
Lactose (g/100g)	4,33 ± 0,02
Densidade (g.ml ⁻¹)	1,030 ± 0,001
pH	6,65 ± 0,12

*Resultados expressos em média ± DP.

**ESD – extrato seco desengordurado

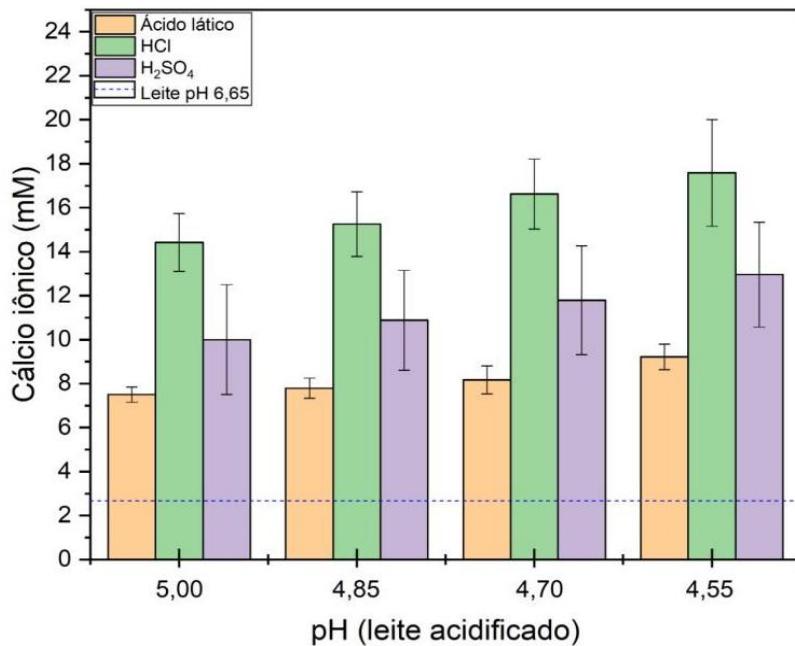
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Todos os constituintes analisados nas amostras de leite reconstituído encontram-se em conformidade com os limites estabelecidos pela Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018 (IN 76), emitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Com base nesses resultados, é possível classificar os leites avaliados como tecnologicamente aptos para utilização na fabricação de derivados lácteos, uma vez que atendem aos requisitos legais de composição e qualidade (Brasil, 2018).

A realização das análises físico-químicas para a determinação dos constituintes do leite é de suma importância, uma vez que tais componentes exercem influência direta sobre as propriedades físico-químicas dos produtos derivados, especialmente no que diz respeito à textura, estrutura e estabilidade. Além disso, essas características impactam significativamente o rendimento industrial, sobretudo na produção de queijos, onde variações na composição podem refletir em perdas ou ganhos durante o processamento (Dias; Antes, 2014).

Na Figura 5, são apresentados os valores médios de cálcio iônico medidos em diferentes condições de pH. Primeiramente, considera-se o cálcio iônico presente nos leites reconstituídos, cujo pH médio foi de 6,65. Em seguida, são mostrados os valores obtidos após acidificação controlada do leite, em quatro níveis distintos de pH: 5,00; 4,85; 4,70 e 4,55. Esses dados são relevantes para compreender o comportamento do cálcio iônico em função da acidez, especialmente em processos que envolvem coagulação ácida, etapa fundamental na fabricação do Requeijão e outros produtos lácteos fermentados.

Figura 5 - Valores médios de cálcio iônico do leite acidificado com diferentes ácidos e em diferentes pH medidos na temperatura de 5°C (mM)*.



*Resultados expressos em média \pm DP .

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A Figura 5 ilustra o comportamento do teor de cálcio iônico presente na matriz láctea. Observa-se um aumento progressivo dos valores de cálcio iônico no leite ao longo do processo de acidificação. À medida que o pH foi reduzido de forma controlada até o valor de 4,55, utilizando-se os três diferentes ácidos, verificou-se um aumento gradual na concentração de cálcio livre (na forma iônica) em todos os tratamentos. A liberação de cálcio iônico durante a acidificação está diretamente relacionada à desestabilização das micelas de caseína, passo essencial na formação de coalhada e coagulação do leite (Gaucheron, 2005).

Esse comportamento está diretamente relacionado à influência do pH na distribuição do cálcio entre suas diferentes formas químicas no meio, uma vez que a acidificação promove a dissociação das micelas de caseína e a consequente liberação do cálcio ligado à estrutura proteica para o meio aquoso. Tais alterações têm implicações significativas na estabilidade térmica do leite e na dinâmica da coagulação, etapas fundamentais no processo de produção de massa coalhada e queijos, conforme demonstrado por Sunkesula *et al.* (2021).

Quando se analisam os efeitos dos diferentes ácidos utilizados, observa-se que, independentemente do pH avaliado, os leites acidificados com ácido clorídrico e ácido sulfúrico apresentaram valores mais elevados de cálcio iônico em comparação ao tratamento com ácido lático. Essa diferença pode ser atribuída às propriedades químicas distintas dos ácidos empregados. Os ácidos clorídrico e sulfúrico são classificados como ácidos fortes, caracterizados por apresentarem grau de ionização igual ou superior a 50% em solução aquosa, o que resulta em liberação imediata e intensa de íons hidrogênio (H^+). Por outro lado, o ácido lático, classificado como um ácido fraco, apresenta uma ionização inferior a 5% em meio aquoso, o que confere um comportamento mais gradual e tamponado na acidificação da matriz. Essa menor disponibilidade de íons H^+ no caso do ácido lático reduz a velocidade e a extensão da liberação de cálcio iônico para o meio (Souza, 2023).

No pH inicial (6,65), os valores de cálcio iônico não apresentaram diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos. Este fato pode ser explicado pelo uso de uma mesma base de leite reconstituído em todos os ensaios, garantindo uniformidade na matriz de partida.

Assim, as variações observadas entre as variações de pH refletem mais intensamente a influência específica do tipo de ácido utilizado do que a composição do leite. Ácidos minerais fortes como o clorídrico tendem a promover uma liberação mais

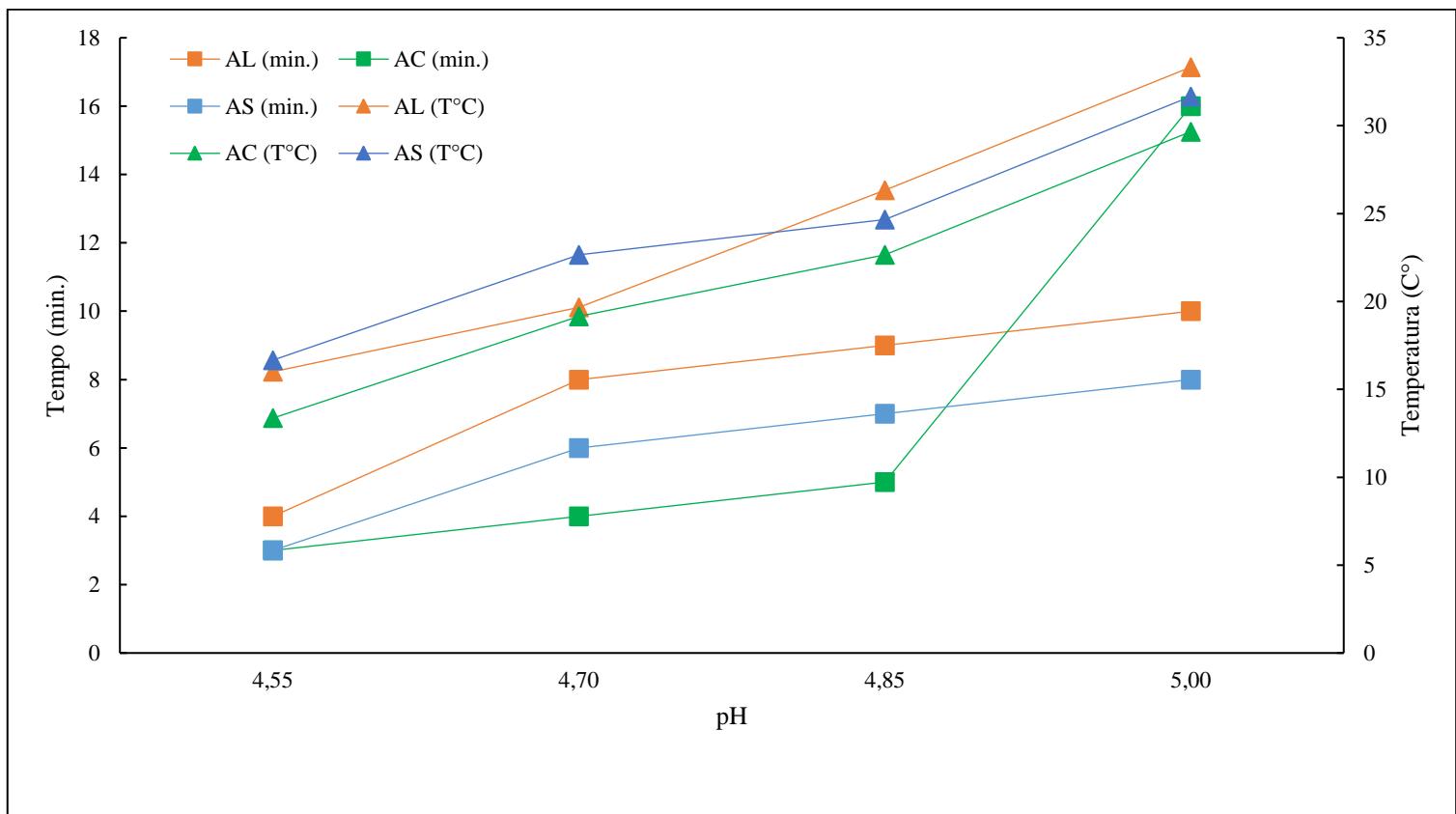
intensa e rápida de cálcio, o que pode favorecer uma coagulação mais intensa. Ácidos orgânicos, como o lático, promovem uma acidificação mais suave, mais próxima das condições naturais de fermentação, e podem gerar coalhadas mais delicadas e com melhor retenção de umidade (Araujo, 2023; Ferreira, 2023).

5.1.2 Acompanhamento do Processo de Coagulação

Com o intuito de contribuir para a otimização de processos industriais voltados à produção contínua de massa coalhada destinada especialmente à fabricação de Requeijão cremoso, foi avaliado o comportamento do leite acidificado durante a fase inicial de coagulação. Para isso, foram monitorados dois parâmetros fundamentais: o tempo necessário e a temperatura correspondente ao início da coagulação dos leites submetidos à acidificação com diferentes tipos de ácidos, em distintos níveis de pH.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 6. A análise dessa figura possibilita uma compreensão mais aprofundada dos efeitos combinados do pH e do tipo de ácido sobre a coagulação do leite, fornecendo subsídios técnicos relevantes para a padronização e o aprimoramento do processo em escala industrial.

Figura 6 - Tempo e temperatura médios de início da coagulação do leite com diferentes ácidos e diferentes pH*.



AL – ácido lático; AC - ácido clorídrico; AS – ácido sulfúrico; min. – minutos; T°C temperatura em graus Celsius.

*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O processo de aquecimento total realizado durante a etapa de coagulação do leite apresentou uma duração média de 33 minutos, com a elevação controlada da temperatura de 5 °C até 55 °C. Essa elevação ocorreu de forma contínua e uniforme, resultando em uma taxa média de aquecimento de aproximadamente 1,57 °C por minuto. Tal controle térmico é fundamental para garantir a reproduzibilidade das condições experimentais e a avaliação precisa dos pontos de início da coagulação em diferentes condições de pH e tipos de ácidos utilizados.

No que diz respeito ao tempo necessário para o início da coagulação, observou-se uma variação significativa. O tempo médio mais curto, de apenas 3 minutos, foi registrado para o leite acidificado com ácido clorídrico a pH 4,55, indicando uma rápida desestabilização das micelas de caseína sob essa condição. Por outro lado, o tempo mais

prolongado, de 16 minutos, foi observado também em formulação com ácido clorídrico, porém em pH 5,00, evidenciando que o aumento do pH reduz a eficiência da coagulação, exigindo maior tempo de exposição ao calor.

Em relação à temperatura de início da coagulação, observa-se variações expressivas entre os diferentes tratamentos. A temperatura mais baixa, de 13,3 °C, foi suficiente para induzir a coagulação no leite acidificado com ácido clorídrico em pH 4,55, enquanto a temperatura mais elevada, de 33,3 °C, foi necessária no caso do leite acidificado com ácido lático em pH 5,00. Esses dados reforçam a tendência de que valores mais baixos de pH diminuem o início da coagulação, tanto em termos de tempo quanto de temperatura, especialmente quando ácidos fortes são empregados.

Do ponto de vista bioquímico, a acidificação do leite promove importantes alterações na estrutura das micelas de caseína, em especial na κ -caseína (κ -CN), que desempenha papel essencial na estabilização coloidal das micelas. A redução do pH provoca a diminuição da repulsão eletrostática na superfície micelar, desestabilizando o sistema coloidal e permitindo a agregação progressiva das micelas, levando à formação do coágulo em função do aumento da temperatura (Sgarbieri, 2005).

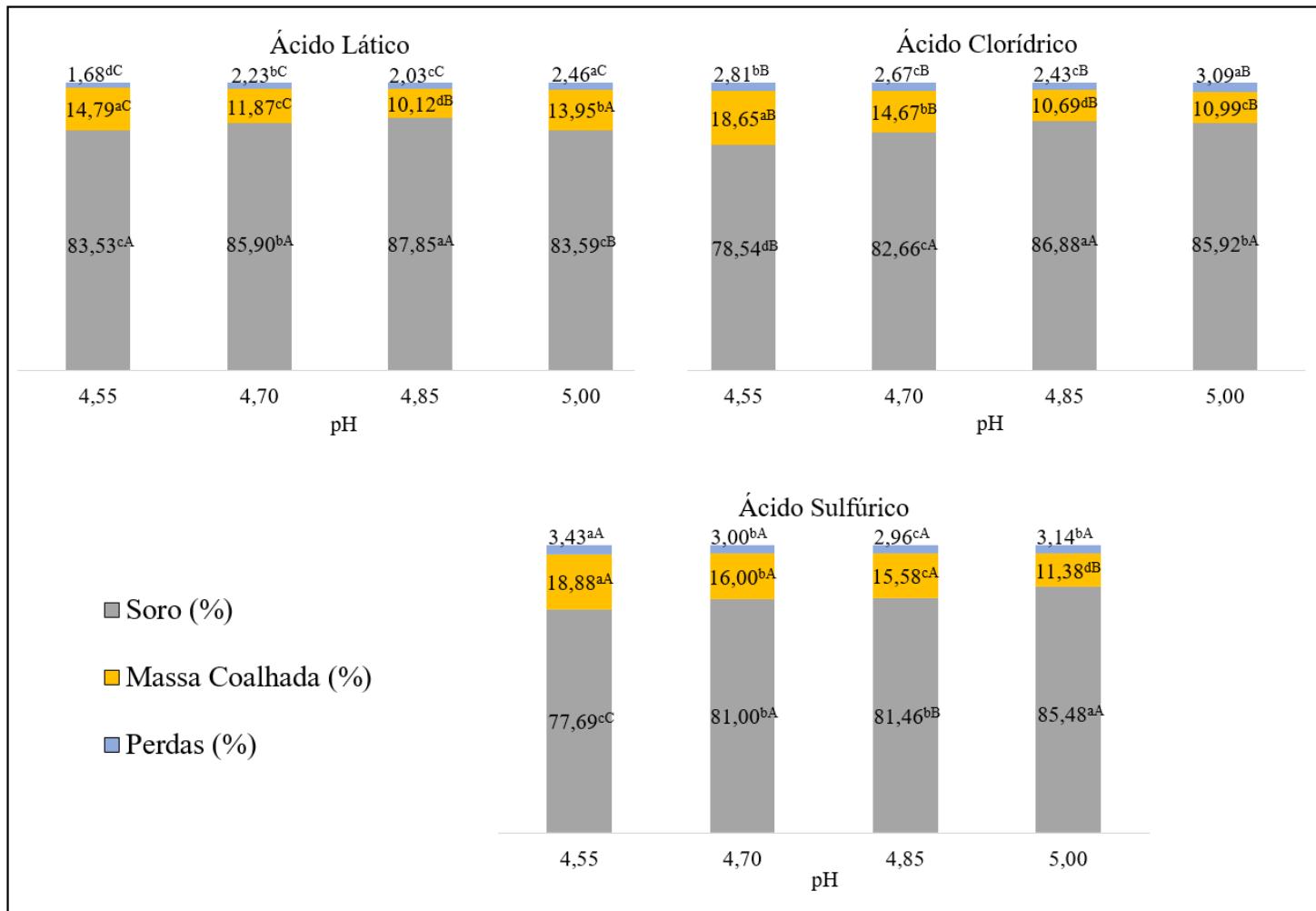
A observação do ácido lático apresentar os maiores tempos e temperaturas para iniciar a coagulação em comparação aos demais ácidos em quase todos os pHs, corrobora com a sua natureza de ácido fraco, o que implica em menor grau de dissociação iônica, reduzindo a liberação imediata de prótons (H^+) e, portanto, diminuindo sua eficiência na desestabilização proteica. Ácidos fortes promovem uma coagulação mais rápida e eficiente em menor temperatura, o que pode ser vantajoso em processos industriais onde a economia de tempo e energia é desejada. Segundo Sunkesula *et al.* (2021), a interação entre pH e força iônica afeta diretamente o ponto de desestabilização micelar, sendo, portanto, determinantes críticos na eficiência e qualidade do processo de coagulação em sistemas lácteos acidificados.

5.2 BALANÇO DE MASSA E RENDIMENTO AJUSTADO

Os percentuais médios correspondentes às frações de soro, massa coalhada obtida e perdas associadas ao processo foram calculados com base nas massas coletadas em cada etapa e estão ilustrados graficamente na Figura 7. A aplicação do balanço de massa teve como principal finalidade o monitoramento sistemático do processo de separação das fases líquida (soro) e sólida (massa coalhada), além da quantificação das perdas ocorridas

ao longo da condução dos experimentos. Essa metodologia permitiu mensurar a eficiência de recuperação da matéria-prima láctea, conferindo robustez ao controle de qualidade do processo.

Figura 7 - Percentual médio de soro, massa coalhada e perdas do processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m) *.



^{a,b,c} Letras iguais no mesmo ácido não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$); ^{A,B,C} Letras iguais entre os ácidos não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os dados foram expressos em percentuais médios de massa coalhada, soro e perdas, permitindo comparar a eficiência e a retenção de sólidos durante a coagulação em função do tipo de ácido e do pH. O percentual de perdas durante o processo de coagulação variou entre 1,68%, registrado na produção com ácido lático em pH 4,55, sendo esse o

melhor aproveitamento da matéria-prima, até 3,43%, observado no tratamento realizado com ácido sulfúrico no mesmo pH, caracterizando o maior índice de perda entre os ensaios.

As maiores perdas foram observadas nos tratamentos com ácido sulfúrico, em especial no pH 4,55 (3,43%), o que pode estar relacionado ao excesso de precipitação de finos ou maior aderência nos equipamentos. Independentemente do valor de pH utilizado para acidificação, os tratamentos conduzidos com ácido sulfúrico apresentaram, de forma consistente, as maiores proporções de perda, seguidos pelos tratamentos realizados com ácido clorídrico. As menores perdas foram, de maneira recorrente, associadas ao tratamento com ácido lático.

Durante a execução dos experimentos, todas as etapas operacionais, incluindo a acidificação do leite a frio, o aquecimento gradual até a ocorrência da coagulação e, posteriormente, a separação da massa precipitada (proteínas coaguladas) da fase líquida (soro), foram padronizadas. Essa padronização visou garantir a reproduzibilidade dos dados e minimizar variabilidades experimentais que pudessem comprometer os resultados, assegurando que as perdas observadas fossem inerentes à ação dos diferentes ácidos e não ao método experimental.

De modo geral, observa-se que pHs mais ácidos (4,55) favorecem a formação de maior quantidade de coalhada, principalmente com o uso de ácidos fortes, o que reforça o papel do pH e da força do ácido na desestabilização micelar. O soro, indicado pelas barras cinza, representa a fase líquida separada da coalhada e consiste majoritariamente em água, lactose, minerais solúveis e proteínas do soro. Os resultados apontam que os maiores volumes de soro foram obtidos em tratamentos com menores percentuais de massa coalhada, como no ácido lático em pH 4,85 (87,85%) e ácido clorídrico em pH 4,85 (86,88%). Isso reflete uma menor retenção de sólidos e maior fração líquida.

O menor valor de soro foi observado com ácido sulfúrico em pH 4,55 (77,69%), compatível com o maior rendimento de coalhada. As perdas (em azul) indicam o percentual de amostras que não foram recuperadas nem na fase de coalhada nem na de soro, podendo ser atribuídas a resíduos aderidos aos recipientes, manipulação ou ineficiência na separação.

O controle sistemático do balanço de massa e do rendimento em processos de produção de derivados lácteos é fundamental para a avaliação da eficiência na utilização dos recursos, especialmente a matéria-prima leite. Além disso, permite diagnosticar eventuais falhas operacionais e implementar melhorias tecnológicas. Conforme

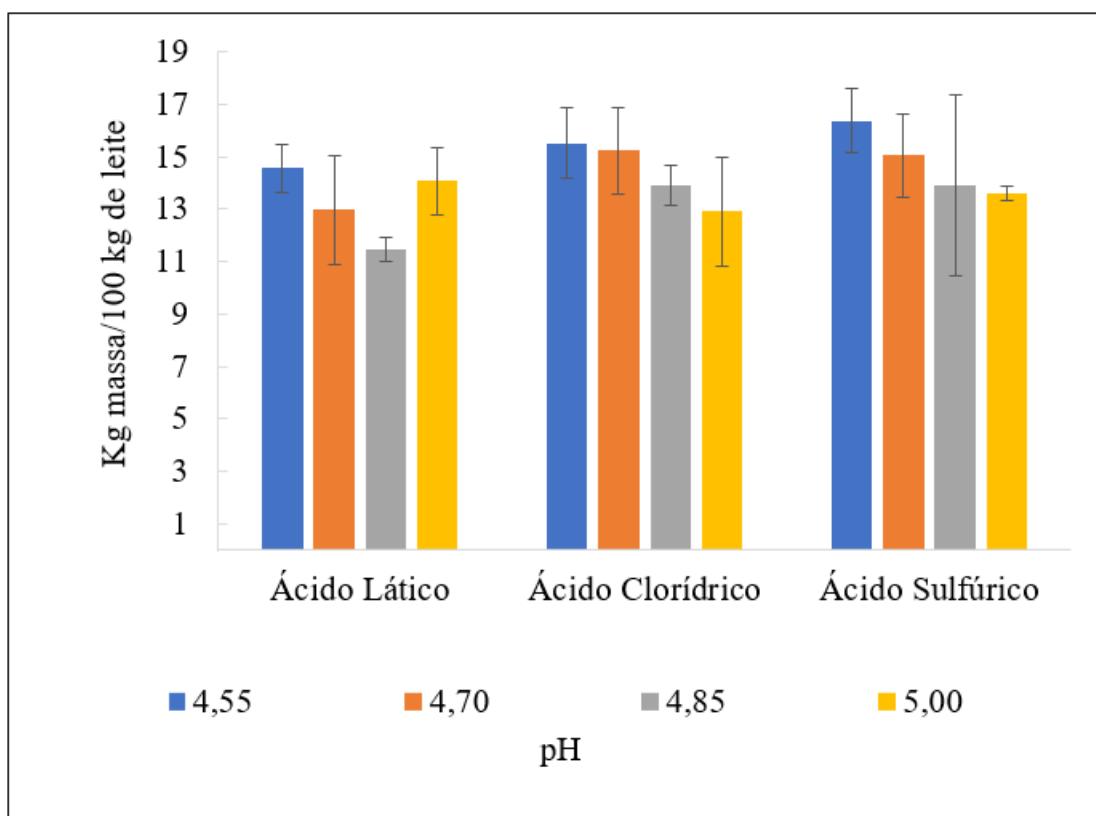
ressaltado por Sales *et al.* (2016), a análise do rendimento é uma ferramenta essencial para o aprimoramento contínuo dos processos industriais, viabilizando ganhos de produtividade e redução de desperdícios.

Para uma avaliação mais precisa e padronizada do desempenho na fabricação de massa coalhada, é empregada a metodologia de cálculo do rendimento ajustado. Este tipo de análise constitui uma ferramenta essencial para o controle de qualidade e otimização dos processos produtivos em unidades industriais de laticínios, pois permite a comparação equitativa entre diferentes lotes de produção ao considerar variáveis fundamentais como o teor de umidade. O rendimento ajustado tem como objetivo compensar as variações no teor de umidade observado nas massas coalhadas produzidas, ajustando os resultados de rendimento com base em um valor de umidade de referência. Dessa forma, garante-se que os dados obtidos reflitam com maior fidelidade a eficiência do processo produtivo, independentemente das oscilações no teor de água presente nas amostras (Perrone *et al.*, 2010).

Na Figura 8, são apresentados os valores de rendimento ajustado das massas coalhadas obtidas a partir de diferentes tratamentos de coagulação, os quais envolveram o uso de distintos ácidos, bem como variações nos níveis de pH. Para a realização desse cálculo, foi adotado como referência um teor de umidade desejado de 73% ($m.m^{-1}$). Este valor de referência foi estabelecido com base em uma média dos teores de umidade obtidos em ensaios preliminares conduzidos previamente, os quais permitiram identificar um ponto representativo e tecnicamente viável para aplicação na padronização dos dados.

Assim, o uso do rendimento ajustado não apenas proporciona uma visão mais acurada do aproveitamento da matéria-prima leite na formação da massa coalhada, mas também permite avaliar de forma crítica e comparativa o desempenho de diferentes condições tecnológicas de processamento, contribuindo significativamente para o aprimoramento dos parâmetros operacionais em escala industrial.

Figura 8 - Rendimento ajustado (kg massa coalhada/100 kg de leite)*.



*Resultados expressos em média \pm DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores médios de rendimento ajustado observados durante o processo de coagulação ácida do leite apresentaram variação significativa em função do tipo de agente acidulante e do pH final de acidificação. Os menores rendimentos ajustados foram obtidos utilizando o ácido lático, com valor médio de 11,47 kg de massa coalhada por 100 kg de leite, quando o pH final foi ajustado para 4,85. Em contrapartida, os maiores rendimentos foram registrados com o uso de ácido sulfúrico, atingindo 16,36 kg de massa por 100 kg de leite, no pH final de 4,55.

As massas coalhadas obtidas por meio da acidificação com o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico, apresentaram rendimentos ajustados superiores em comparação àquelas produzidas com ácido lático, independentemente do valor de pH utilizado no processo de acidificação. Essa tendência sugere uma maior eficiência dos ácidos inorgânicos na precipitação das proteínas do leite, promovendo maior recuperação de sólidos na massa formada.

Ao comparar os diferentes níveis de pH utilizados na acidificação do leite, verificou-se que o pH 4,55 proporcionou os maiores valores de rendimento ajustado para

todos os tipos de ácido empregados. Esse comportamento indica que a faixa de pH mais baixa favorece a coagulação proteica e a retenção de umidade na matriz da coalhada.

No que se refere aos fatores que influenciam diretamente o rendimento na produção de massas coalhadas, destaca-se a composição da fração sólida obtida, sendo o teor de umidade a variável mais determinante. A presença de maior quantidade de água na massa contribui para o aumento do rendimento final do processo. No entanto, é fundamental que o teor de umidade da coalhada esteja em conformidade com os padrões estabelecidos para garantir as propriedades funcionais e sensoriais desejadas no produto acabado, conforme apontado por Furtado (1991).

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS MASSAS COALHADAS

Nesta etapa do estudo, foram realizadas análises físico-químicas das massas coalhadas produzidas por meio do processo de coagulação do leite utilizando diferentes tipos de ácidos, bem como variações no pH. Os resultados obtidos a partir dessas análises permitiram avaliar como o tipo de ácido e o nível de acidez influenciam as características finais das massas coalhadas.

5.3.1 pH das massas coalhadas

Os valores médios de pH medidos nas amostras das massas coalhadas formadas sob essas diferentes condições experimentais encontram-se organizados e apresentados na Tabela 8, possibilitando a comparação entre os tratamentos e a interpretação dos efeitos dos parâmetros avaliados.

Tabela 8 - Valores médios de pH das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH*

pH	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
5,00	5,15 ± 0,07 ^{aA}	5,30 ± 0,18 ^{aA}	5,08 ± 0,16 ^{aA}
4,85	4,92 ± 0,10 ^{bB}	4,99 ± 0,19 ^{bA}	4,85 ± 0,27 ^{bC}
4,70	4,78 ± 0,11 ^{cB}	4,86 ± 0,20 ^{cA}	4,76 ± 0,17 ^{cB}
4,55	4,56 ± 0,06 ^{dB}	4,66 ± 0,23 ^{dA}	4,52 ± 0,18 ^{dC}

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média ± DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O pH médio das amostras de soro obtidas após a coagulação do leite apresentou variações significativas em função do tipo de ácido utilizado no processo de acidificação. Observou-se que os menores valores de pH foram registrados nas amostras tratadas com ácido lático, atingindo uma média de 4,56, enquanto as amostras submetidas à acidificação com ácido clorídrico apresentaram os valores mais elevados, com média de 5,30. Análises estatísticas revelaram que houve diferença significativa entre os tratamentos quanto aos tipos de ácidos empregados e os valores de pH utilizados durante a acidificação. Isso indica que tanto a natureza do agente acidificante quanto o nível de pH inicial do leite exercem efeitos relevantes sobre o comportamento das massas coalhadas formadas.

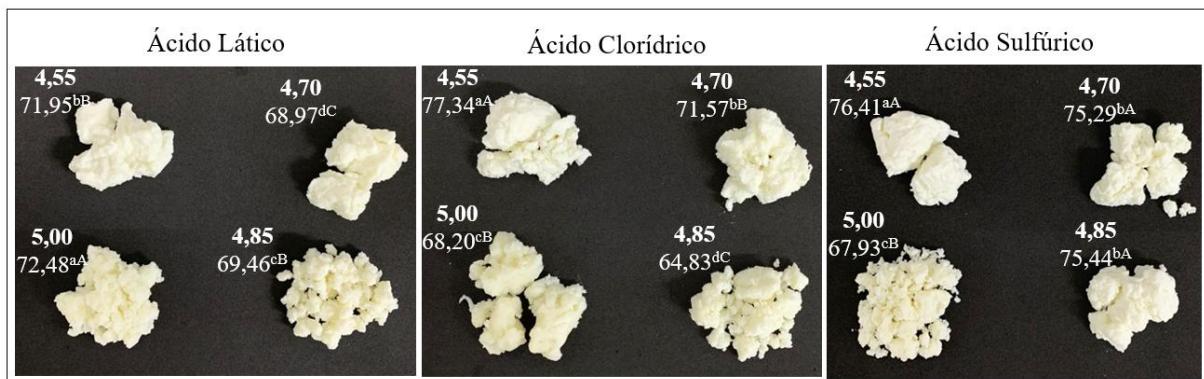
Os valores de pH das massas coalhadas e dos soros possuem correlação com o pH de acidificação dos leites de 0,948: as massas provenientes de tratamentos com pH mais elevado (5,00) apresentaram valores de pH maiores, enquanto aquelas obtidas a partir de acidificações mais intensas (pH 4,55) mostraram pH final mais baixo. Essa tendência reforça a influência do ambiente ácido na composição e nas propriedades da coalhada.

Outro aspecto importante observado foi a relação entre o pH da massa coalhada e o seu teor de cálcio. À medida que o pH é reduzido, ocorre um aumento na desmineralização das micelas de caseína, favorecendo a liberação de cálcio para o soro. Este fenômeno tem implicações tecnológicas relevantes, especialmente na produção de Requeijão cremoso, em que o grau de desmineralização da massa no momento da fusão está intimamente ligado à sua fluidez e cremosidade e nas características sensoriais desejáveis no produto final, conforme apontado por Mozuraityte *et al.* (2019).

5.3.2 Umidade das massas coalhadas

Os valores médios de umidade, bem como outras características físicas das massas coalhadas obtidas sob diferentes condições de acidificação, foram determinados e estão apresentados de forma ilustrativa na Figura 9 e 10. Esses dados complementam as análises anteriores e oferecem uma visão mais abrangente sobre o impacto das variáveis estudadas nas propriedades tecnológicas das massas.

Figura 9 - Umidade % (m.m-1) e características físicas das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH*.



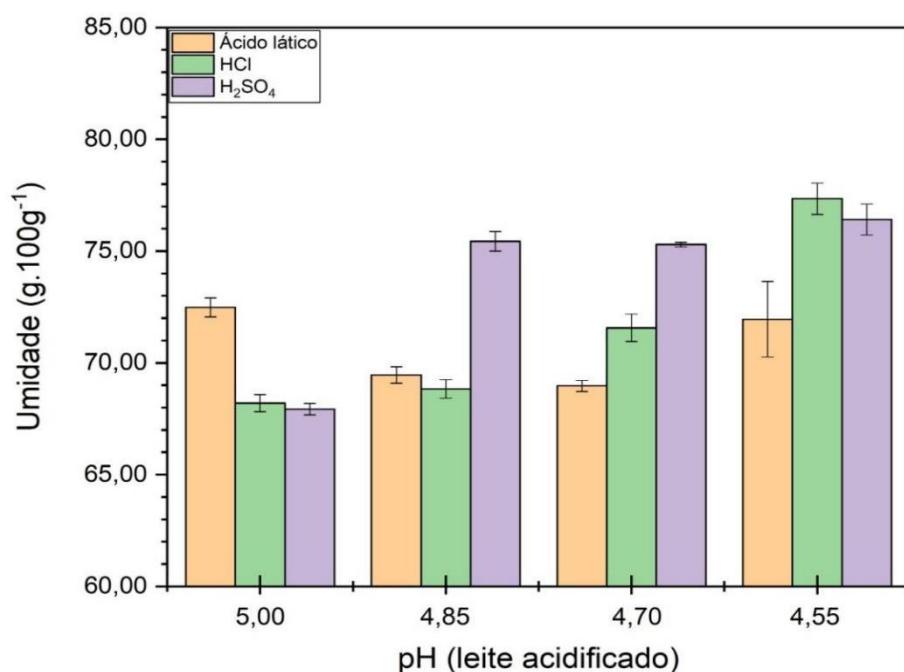
a,b,c Letras iguais no mesmo ácido não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$); ^{A,B,C}

Letras iguais entre os ácidos não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Figura 10 - Umidade das massas coalhadas obtidas após a coagulação do leite acidificado com diferentes ácidos e em diferentes pH.



*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

É possível observar uma diferença visual evidente nas características físicas das massas coalhadas obtidas a partir dos diferentes tratamentos de coagulação. Essa variação

nas propriedades físicas está fortemente associada ao teor de umidade das amostras analisadas, o qual apresentou diferença estatisticamente significativa, conforme evidenciado pelos dados obtidos.

De forma específica, as massas coalhadas que foram elaboradas por meio da acidificação do leite utilizando ácido clorídrico e ácido sulfúrico mostraram maiores níveis de umidade quando o processo foi conduzido sob pH de 4,55 (Figura 10). Esses resultados indicam que, sob condições mais ácidas, tais ácidos favorecem a retenção de umidade na massa formada. Essa observação pode ser associada com os valores de rendimento ajustado obtidos, já apresentados anteriormente na Figura 8, indicando que há uma coerência entre o teor de umidade e o desempenho do processo em termos de aproveitamento da massa.

5.3.3 Recuperação dos constituintes sólidos do leite

No contexto da fabricação de queijos e produtos lácteos similares, é desejável que ocorra uma maior recuperação dos constituintes sólidos do leite na fase sólida (massa), ao mesmo tempo em que se busca minimizar as perdas desses nutrientes no soro. A eficiência com que essa recuperação ocorre está diretamente ligada às condições de processamento adotadas e varia consideravelmente conforme o tipo de queijo produzido, os ingredientes utilizados e os parâmetros tecnológicos empregados. Segundo Francolino *et al.* (2010), a taxa de recuperação dos sólidos do leite (como proteínas, gordura e minerais) depende, em grande parte, dos métodos aplicados durante a coagulação e da manipulação posterior da massa.

Para ilustrar esse comportamento de forma comparativa, a Figura 11 apresenta os valores médios de recuperação dos constituintes sólidos do leite, tanto para as massas coalhadas quanto para os respectivos soros gerados durante o processo de coagulação. Esses dados foram obtidos a partir de tratamentos realizados com diferentes tipos de ácidos e em variados níveis de pH, permitindo uma análise abrangente sobre como esses fatores influenciam a eficiência da incorporação dos sólidos do leite na massa final.

Figura 11 - Recuperação dos constituintes sólidos do leite para as massas coalhadas e para os soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH % (m.m⁻¹)*.



^{a,b,c} Letras iguais no mesmo ácido não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$); ^{A,B,C}

Letras iguais entre os ácidos não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores médios de recuperação dos constituintes sólidos do leite incorporados nas massas coalhadas apresentaram variação significativa entre os diferentes tratamentos aplicados durante o processo de coagulação. Esses valores oscilaram entre 37,62% (m.m⁻¹), observados no tratamento com ácido lático em pH 4,85, e 48,01% (m.m⁻¹), obtidos quando se utilizou ácido clorídrico em pH 4,55. Essa variação revela o impacto direto tanto do tipo de ácido utilizado quanto do nível de pH aplicado na eficiência da retenção dos sólidos do leite na massa formada.

Foi constatada uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras analisadas, o que confirma a influência dos parâmetros avaliados sobre o comportamento das coalhadas. Além disso, os resultados observados encontram-se de acordo com os valores de rendimento ajustado, apresentados anteriormente na Figura 8. O tratamento que obteve menor taxa de recuperação dos constituintes sólidos na massa, pH 4,85 com

ácido lático, foi também aquele que apresentou o menor rendimento ajustado. Por outro lado, os tratamentos que resultaram nas maiores recuperações de sólidos na massa coalhada, aqueles realizados com ácido clorídrico e ácido sulfúrico em pH 4,55, coincidiram com os maiores valores de rendimento ajustado, evidenciando uma relação direta entre ambos os parâmetros.

O rendimento na fabricação de queijos está fundamentalmente associado à eficiência com que os componentes sólidos do leite são retidos na massa coalhada durante o processo de coagulação. O objetivo principal é maximizar essa retenção, reduzindo ao máximo as perdas para o soro, de forma a produzir uma maior quantidade de queijo a partir de um volume fixo de leite cru. De acordo com Margolies *et al.* (2017), o aumento no rendimento está diretamente relacionado à capacidade tecnológica do processo de incorporação dos sólidos (proteínas, gordura, minerais) do leite na matriz da coalhada.

Complementando essa análise, os valores de recuperação de constituintes do leite nos soros, ou seja, as frações que não foram incorporadas à massa e foram perdidas no soro, apresentaram relação inversamente proporcional à recuperação observada nas massas. Isso significa que os tratamentos que tiveram menor retenção de constituintes na massa, apresentaram consequentemente, maiores perdas no soro. Especificamente, o tratamento com pH 4,85 utilizando ácido lático apresentou os maiores valores de perda de constituintes no soro, enquanto os tratamentos com pH 4,55, acidificados com ácido clorídrico e ácido sulfúrico, resultaram nas menores perdas, refletindo assim melhor desempenho tecnológico e maior eficiência na recuperação dos sólidos do leite.

5.4 ANALISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOROS

5.4.1 pH dos soros

Os valores médios de pH dos soros obtidos no processo de coagulação do leite com diferentes ácidos e diferentes pH são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios de pH dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH*

pH	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
5,00	5,18 ± 0,14 ^{aA}	5,08 ± 0,06 ^{aB}	4,86 ± 0,15 ^{aC}
4,85	4,98 ± 0,21 ^{bA}	4,87 ± 0,07 ^{bB}	4,64 ± 0,22 ^{bC}
4,70	4,82 ± 0,19 ^{cA}	4,66 ± 0,09 ^{cB}	4,60 ± 0,11 ^{cC}
4,55	4,64 ± 0,12 ^{dA}	4,44 ± 0,07 ^{dB}	4,37 ± 0,11 ^{dC}

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média ± DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

O valor médio de pH das diferentes amostras de soro analisadas apresentou variação significativa, oscilando entre 4,37 nas amostras que foram acidificadas com ácido sulfúrico, até 5,18 nas amostras com ácido lático. Esses dados demonstram que os valores de pH dos soros possuem correlação com o pH de acidificação dos leites de 0,853. A análise estatística também mostra que houve uma diferença significativa de acordo com os níveis de pH utilizados nos tratamentos ($P<0,05$).

As amostras que foram acidificadas utilizando ácido lático apresentaram os valores mais elevados de pH. Em seguida, observaram-se as amostras acidificadas com ácido clorídrico, que apresentaram valores intermediários de pH. E por fim, as amostras que apresentaram os menores valores de pH foram aquelas tratadas com ácido sulfúrico, evidenciando uma acidez mais pronunciada.

Ao se analisar os dados em conjunto, nota-se uma clara relação entre o pH das soluções utilizadas para acidificar o leite e o pH final das amostras de soro resultantes do processo. De maneira geral, os soros provenientes de tratamentos nos quais o leite foi acidificado até atingir pH 5,00 apresentaram valores de pH mais elevados, enquanto aqueles provenientes de leites acidificados até pH 4,55 demonstraram valores mais baixos de pH no soro. Essa tendência reforça a ideia de que o nível de acidificação inicial do leite influencia diretamente a composição e as características físico-químicas do soro obtido.

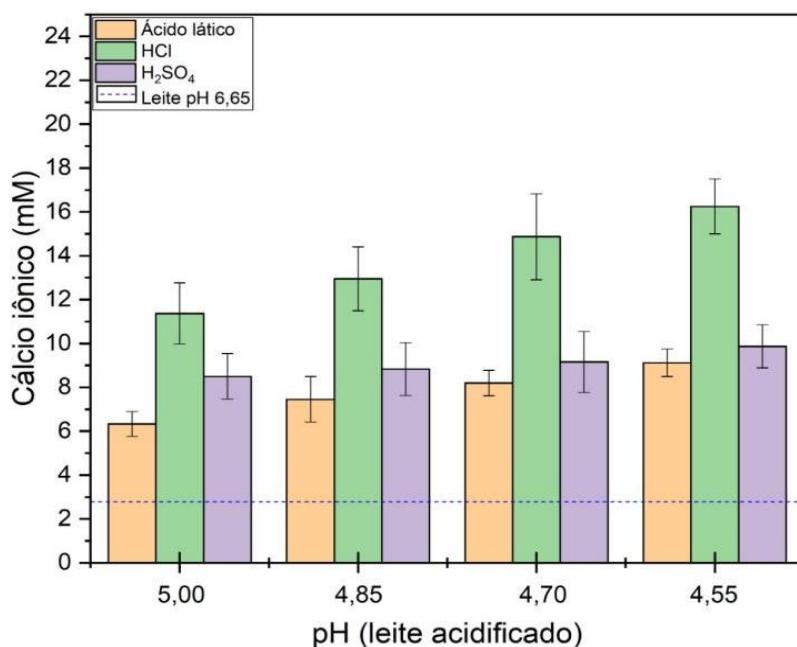
É importante destacar que, independentemente do tipo de ácido utilizado ou do valor de pH empregado no processo de acidificação, todas as amostras analisadas apresentaram valores de pH dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira vigente. Segundo as normas regulatórias definidas por Brasil (2020), o soro ácido deve

apresentar um teor de pH inferior a 6,0, o que foi respeitado em todas as condições experimentais avaliadas no presente estudo.

5.4.2 Cálcio iônico do soro

Os valores médios de cálcio iônico dos soros obtidos no processo de coagulação do leite com diferentes ácidos e diferentes pH são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Valores médios de cálcio iônico dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH medidos na temperatura de 5°C (mM)*.



^{a,b,c} Letras iguais no mesmo ácido não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$); ^{A,B,C} Letras iguais entre os ácidos não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Foi observada uma diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos aplicados no processo de acidificação do leite, o que indica que o tipo de ácido utilizado influenciou diretamente os resultados obtidos em relação aos teores de cálcio iônico presentes no soro. De acordo com os dados analisados, as amostras que foram acidificadas com ácido clorídrico apresentaram os maiores valores de cálcio iônico, evidenciando maior solubilização desse mineral. Em seguida, foram observadas as

amostras tratadas com ácido sulfúrico, que apresentaram valores intermediários. E por fim, os menores teores de cálcio iônico foram encontrados nas amostras que passaram por acidificação com ácido lático, sugerindo menor eficiência na liberação do cálcio coloidal para a fase líquida.

Essa variação nos teores de cálcio iônico nos diferentes tratamentos está diretamente relacionada ao pH de acidificação do leite, que influencia o equilíbrio entre as formas coloidal e solúvel do cálcio. De maneira geral, verificou-se que os menores teores de cálcio iônico foram encontrados nos tratamentos em que o leite foi acidificado até atingir pH 5,00, enquanto os maiores teores foram observados nos tratamentos realizados com pH final de 4,55. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que, em pH mais baixo, há uma maior dissociação das micelas de caseína, o que facilita a liberação do cálcio coloidal para a fase solúvel, que, após a coagulação e separação da massa coagulada, permanece no soro.

Além do efeito do pH em si, outro fator relevante é a força do ácido utilizado na acidificação. Ácidos fortes, como o ácido clorídrico e o ácido sulfúrico, possuem maior capacidade de dissociação iônica, o que favorece a quebra das interações entre as micelas de caseína e o cálcio coloidal, promovendo, assim, sua migração para a fase líquida. Esse fenômeno não ocorre da mesma forma com ácidos mais fracos, como o ácido lático, que apresentam menor grau de ionização, resultando em menor solubilização do cálcio.

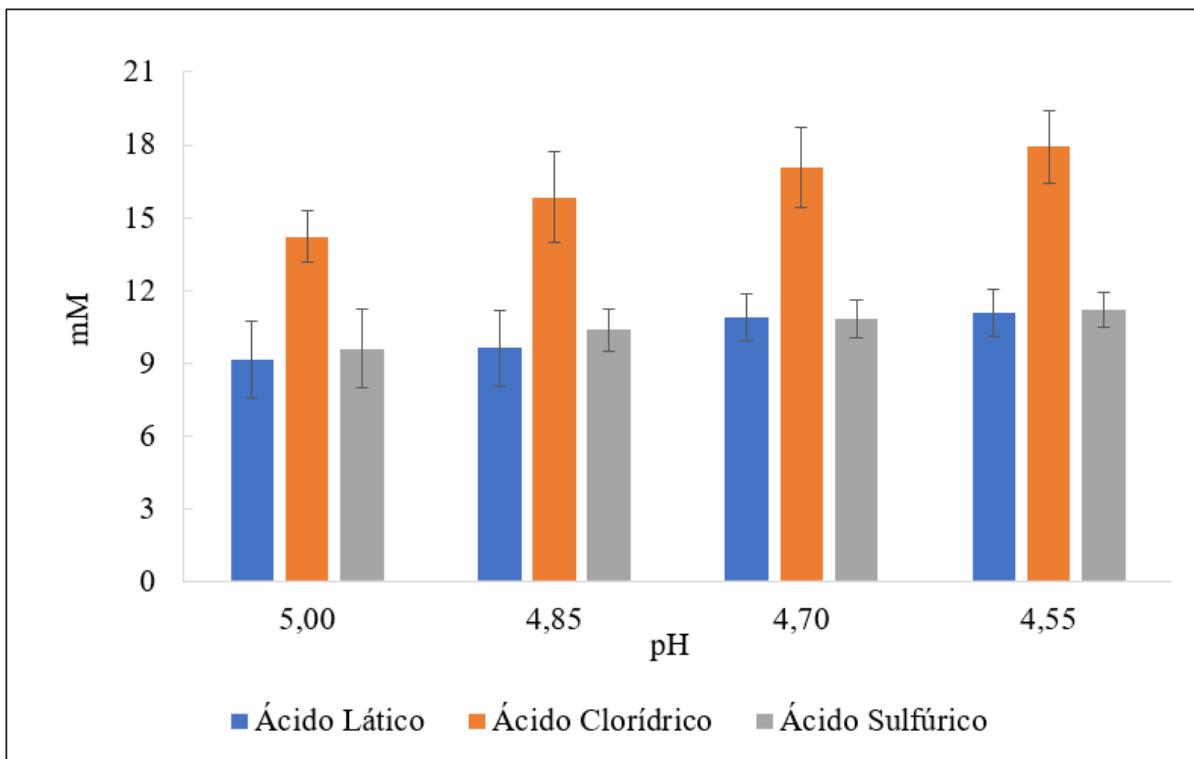
Conforme ilustrado na Figura 5, que apresenta os valores de cálcio iônico no leite submetido à acidificação, é possível observar uma tendência semelhante nos valores obtidos para o soro. De maneira consistente, os valores médios de cálcio iônico presentes no soro foram mais elevados nos tratamentos em que o leite foi acidificado com ácido clorídrico. Essa observação pode ser atribuída ao fato de o ácido clorídrico ser classificado como um ácido forte, o que reforça seu efeito mais pronunciado na solubilização do cálcio.

5.4.2.1 Cálcio iônico em pH 4,00

A Figura 13 complementa esses achados ao apresentar os valores médios de cálcio iônico em pH 4,00 medidos nas amostras de soro obtidas após a coagulação do leite com diferentes ácidos e em distintos valores de pH. O processo de acidificação das amostras de soro até o pH 4,0 tem o objetivo de dissociar todo o cálcio coloidal para a fase iônica, permitindo sua determinação como cálcio total da amostra. Esses resultados visam

demonstrar de forma clara a influência tanto do tipo de ácido quanto do pH final do tratamento sobre a concentração de cálcio iônico no soro, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos químicos envolvidos na separação das fases durante o processamento do leite.

Figura 13 - Valores médios de cálcio iônico em pH 4,00 dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH medidos na temperatura de 5 °C (mM)*.



*Resultados expressos em média \pm DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os valores de cálcio iônico medidos nas amostras de soro ajustadas para pH 4,00 apresentaram variação considerável, oscilando entre 9,12 mM nas amostras provenientes do tratamento com ácido sulfúrico em pH 5,00, até 17,91 mM nas amostras tratadas com ácido clorídrico em pH 4,55. Esses dados indicam que tanto o tipo de ácido utilizado quanto o pH final de acidificação exercem influência direta sobre a quantidade de cálcio iônico presente na fase líquida do sistema, ou seja, no soro do leite.

Dessa forma, é possível inferir que o uso do ácido clorídrico, em especial na condição de pH final de 4,55, foi o tratamento mais eficaz para promover a migração do cálcio coloidal para a fase líquida. Após a coagulação da caseína e a consequente

separação da massa coalhada, esse cálcio solubilizado permaneceu retido no soro, resultando em teores mais elevados em comparação com os demais tratamentos. Essa observação reforça a importância do tipo de ácido e do pH de coagulação como fatores determinantes na distribuição do cálcio entre as fases sólida e líquida do leite durante o processo de fabricação de produtos lácteos.

A análise estatística dos dados confirmou que houve diferença estatística significativa ($P<0,05$) entre os ácidos utilizados no processo de acidificação. Mais especificamente, os soros obtidos a partir dos leites acidificados com ácido clorídrico apresentaram os maiores teores de cálcio iônico, evidenciando a maior eficiência desse ácido em promover a solubilização do cálcio. Por outro lado, os soros provenientes dos leites acidificados com ácido lático e ácido sulfúrico apresentaram valores significativamente menores, demonstrando comportamento distinto em função da força do ácido e da sua interação com a estrutura coloidal do leite.

No entanto, ao se avaliar o efeito dos diferentes pH de acidificação para cada um dos três ácidos empregados, não foi observada diferença estatística significativa entre esses níveis de pH. Isso indica que, embora o pH influencie o processo de solubilização de minerais, sua ação pode ser secundária em comparação com a natureza química do ácido utilizado.

5.4.3 Umidade dos soros

Os valores médios de umidade dos soros obtidos durante o processo de coagulação do leite, realizados com diferentes ácidos e diferentes pH, estão organizados e apresentados de forma detalhada na Tabela 10. Esses dados fornecem informações adicionais importantes sobre as características físico-químicas dos soros gerados, complementando a análise do comportamento do cálcio iônico e contribuindo para uma compreensão mais ampla dos efeitos dos tratamentos sobre a composição final do soro.

Tabela 10 - Valores médios de umidade dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m)*.

pH	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
5,00	93,70 ± 0,23 ^{aA}	93,91 ± 0,58 ^{aA}	93,76 ± 0,41 ^{aA}
4,85	93,94 ± 0,48 ^{aA}	93,69 ± 0,45 ^{aA}	93,96 ± 0,11 ^{aA}
4,70	93,80 ± 0,49 ^{aA}	94,13 ± 0,17 ^{aA}	93,86 ± 0,60 ^{aA}
4,55	93,73 ± 0,24 ^{aA}	94,21 ± 0,43 ^{aA}	93,49 ± 0,88 ^{aA}

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores médios de umidade observados nas diferentes amostras de soro obtidas durante o processo de coagulação do leite não apresentaram variação, oscilando entre 93,49% na amostra com ácido sulfúrico em pH 4,55 a 94,21% na amostra com ácido clorídrico em pH 4,55. Essa pequena variação nos valores sugere que, independentemente do tipo de ácido utilizado para a acidificação e do pH final adotado nos tratamentos, a composição do soro manteve-se relativamente constante.

A análise estatística dos dados confirmou que não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os valores de umidade das amostras de soro obtidas a partir dos diferentes tratamentos.

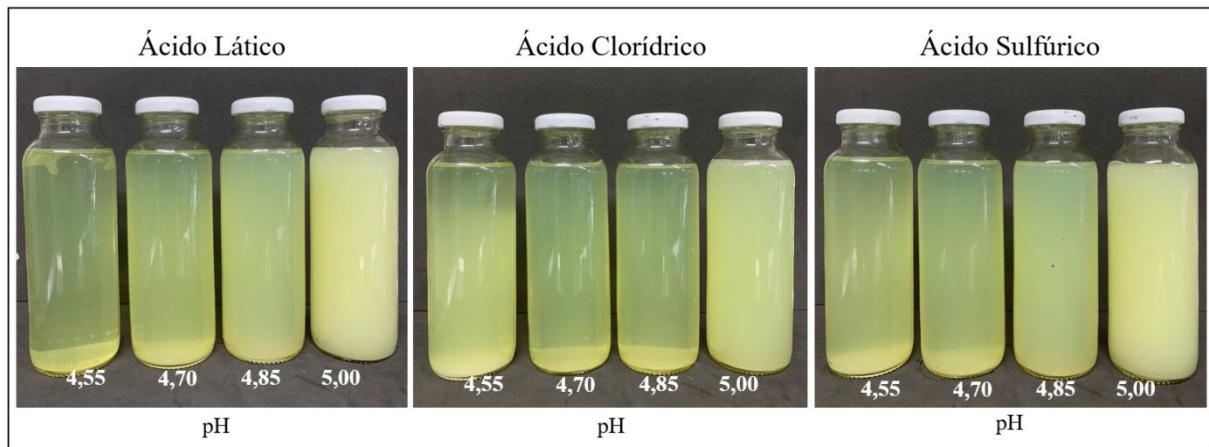
Pela diferença matemática, foi possível calcular os teores médios de sólidos totais das amostras de soro, que consistem na fração composta por proteínas solúveis, lactose, sais minerais e pequenas quantidades de outros compostos residuais. Os valores de sólidos totais variaram entre 5,79% na amostra com ácido clorídrico em pH 4,55 a 6,51% na amostra com ácido sulfúrico em pH 4,55, demonstrando uma leve variação entre os tratamentos. Apesar dessa variação, todas as amostras analisadas apresentaram teores de sólidos totais dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, com um teor mínimo de 5,01% de sólidos totais, valor que foi superado por todas as amostras obtidas no presente estudo.

5.4.4 Tamanho de partículas dos soros

Embora as análises de umidade e sólidos totais não tenham revelado diferenças estatísticas significativas, foi possível observar, visualmente, que as amostras de soro apresentaram diferenças na coloração, conforme ilustrado na Figura 14. Essas variações

de cor podem estar associadas a múltiplos fatores, como a composição específica dos sólidos presentes no soro, a interação entre os ácidos utilizados e os componentes do leite, além de possíveis reações químicas ocorridas durante o processo de acidificação e coagulação.

Figura 14 - Soros obtidos após o processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Observar-se uma diferença visual evidente na coloração das amostras de soro obtidas após a coagulação do leite, em função do tipo de ácido utilizado e do pH final aplicado durante o processo de acidificação. De maneira geral, para os três ácidos avaliados no experimento, as amostras de soro provenientes da acidificação do leite em pH 5,00 apresentaram uma coloração mais opaca e menos translúcida quando comparadas às amostras obtidas a partir da acidificação em pH 4,55. Essa opacidade mais acentuada pode estar associada a alterações na dispersão de partículas em suspensão ou à presença de resíduos proteicos e minerais em maior quantidade ou com diferente grau de agregação nessas condições de pH.

Além disso, ao se comparar os efeitos visuais entre os diferentes tipos de ácido, constatou-se que, de forma geral, os soros obtidos por meio da acidificação com ácido clorídrico apresentaram uma coloração visivelmente mais clara em relação àquelas produzidas com ácido lático e ácido sulfúrico. Essa tonalidade mais clara pode indicar menor interferência de compostos residuais e menor presença de partículas dispersas que absorvam ou refletem a luz, o que sugere um efeito mais eficiente desse ácido na separação das fases durante a coagulação do leite.

O soro de leite, por definição, é um líquido opaco com coloração que varia entre o amarelo e o verde-claro, característica atribuída à presença de compostos como riboflavina e à composição de sólidos totais dissolvidos. De acordo com Mizuta, Silva e Madrona (2023), o teor de sólidos totais é um dos principais fatores que influenciam diretamente a coloração do soro, sendo normalmente responsável por determinar a intensidade e a tonalidade observadas visualmente. No entanto, como neste estudo não foi identificada diferença estatística significativa entre os valores de sólidos totais das diferentes amostras, tornou-se necessário investigar outros fatores que pudessem justificar as variações visuais observadas.

Com o objetivo de compreender melhor as diferenças de aparência entre os soros obtidos, foi realizada uma análise complementar do tamanho médio das partículas presentes nas amostras. O tamanho das partículas pode interferir diretamente na turbidez e na opacidade do líquido, uma vez que partículas maiores ou em maior concentração tendem a dispersar mais luz, tornando o soro visualmente mais turvo. A Tabela 11 apresenta os resultados médios do tamanho das partículas nas diferentes amostras de soro obtidas a partir da coagulação do leite com os diferentes ácidos e em diferentes pH de acidificação. Além disso, os dados incluem os resultados obtidos após a realização de um processo de centrifugação, conduzido a 2000 rotações por minuto (RPM), sob temperatura ambiente controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com o intuito de verificar o comportamento das partículas suspensas e seu possível papel na modificação da aparência visual dos soros.

Tabela 11 - Tamanho das partículas dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH antes e depois da centrifugação (nm)*

pH	DLS		
	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
Antes			
5,00	1234,0 ± 225,15 ^{aA}	1031,43 ± 204,55 ^{aB}	343,60 ± 324,68 ^{aC}
4,85	244,68 ± 7,92 ^{bA}	258,01 ± 11,09 ^{bA}	179,93 ± 3,01 ^{bA}
4,70	182,75 ± 4,38 ^{bA}	190,9 ± 6,72 ^{bA}	181,63 ± 6,84 ^{bA}
4,55	156,31 ± 3,55 ^{cB}	254,16 ± 66,76 ^{bA}	172,33 ± 16,09 ^{bA}
Depois			
5,00	531,58 ± 289,71 ^{aA}	265,3 ± 5,37 ^{aB}	263,26 ± 6,03 ^{aB}
4,85	233,51 ± 5,29 ^{bA}	235,06 ± 7,59 ^{aA}	174,38 ± 2,51 ^{aA}
4,70	146,65 ± 5,79 ^{bA}	177,46 ± 4,18 ^{aA}	178,83 ± 3,98 ^{aA}
4,55	149,03 ± 2,82 ^{bA}	165,35 ± 6,20 ^{aA}	159,31 ± 3,37 ^{aA}

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média ± DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores médios do tamanho das partículas presentes nas diferentes amostras de soro, obtidas antes do processo de centrifugação, apresentaram variação, dependendo do tipo de ácido utilizado e do pH aplicado na acidificação do leite. Especificamente, os tamanhos médios variaram de 1234 nm na amostra de soro oriunda da acidificação com ácido lático em pH 5,00, até 156,31 nm na amostra acidificada com o mesmo ácido, porém em pH 4,55. Essa diferença expressiva evidencia a influência direta do pH e do ácido empregado na formação e agregação de partículas durante o processo de coagulação do leite.

A análise estatística dos dados revelou que houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos, ou seja, os diferentes tipos de ácido e níveis de pH utilizados na coagulação afetaram significativamente o tamanho médio das partículas presentes nos soros. De modo geral, para todos os três ácidos testados, as amostras de soro derivadas da acidificação do leite em pH 5,00 apresentaram tamanhos médios de partículas maiores do que aquelas obtidas nos tratamentos realizados em pH 4,55. Essa tendência sugere que, em pH mais elevado, a estrutura proteica e a estabilidade coloidal do sistema favorecem a formação de agregados maiores, possivelmente devido à menor dissociação das proteínas e à menor intensidade da precipitação.

A explicação para essa diferença significativa no tamanho médio das partículas pode estar associada principalmente ao comportamento da β -lactoglobulina, que é a principal proteína solúvel presente no soro do leite bovino. A conformação estrutural da β -Lg é altamente sensível ao pH do meio, uma vez que sua estrutura quaternária se altera conforme a concentração de íons hidrogênio. De acordo com Fox e McSweeney (1998), em valores de pH abaixo de 3,5, a β -Lg se encontra predominantemente na forma de monômeros. Quando o pH varia entre 3,5 e 4,0, essas moléculas monoméricas tendem a se associar, formando dímeros. Já em intervalos de pH entre 4,0 e 6,0, esses dímeros podem se organizar em estruturas ainda maiores, como octômeros, aumentando consideravelmente o tamanho das partículas presentes no soro. Essa característica explica, em grande parte, os maiores tamanhos observados nas amostras com pH 5,00, nas quais a agregação proteica é mais pronunciada.

Para complementar a análise físico-química das amostras de soro e compreender melhor o comportamento das partículas em suspensão, foi realizado um processo de centrifugação. Essa etapa teve como objetivo separar mecanicamente as partículas dispersas no soro, sedimentando os agregados maiores e, assim, permitir a avaliação da fração líquida restante.

Após o procedimento de centrifugação, observou-se uma redução nos valores médios de tamanho das partículas nas amostras de soro, indicando que a remoção dos agregados maiores foi eficaz. Essa redução foi estatisticamente significativa nos tratamentos realizados com os três diferentes ácidos, mas essa diferença foi observada apenas para o pH 5,00. Isso sugere que, neste pH, a presença de agregados maiores é mais relevante, e a ação da centrifugação tem um impacto mais pronunciado sobre o perfil de distribuição de partículas. Em contrapartida, nos soros obtidos a pH 4,55, a menor formação de agregados torna o efeito da centrifugação menos expressivo em termos de redução do tamanho médio de partículas.

5.4.5 Proteínas do soro

Com o intuito de aprofundar a caracterização das amostras e compreender melhor os componentes que compõem a fração dispersa do soro, foram realizadas análises adicionais para determinar o perfil proteico das amostras. Essa etapa visa identificar as principais proteínas presentes no soro, bem como possíveis modificações estruturais resultantes do processo de acidificação.

As concentrações de β -LG e α -LA nos soros obtidos no processo coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH foram determinadas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentrações de β -LG e α -LA nos soros obtidos no processo coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)*.

pH	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
		β -Lactoglobulina	
5,00	$0,354 \pm 0,110^{\text{aA}}$	$0,432 \pm 0,196^{\text{aA}}$	$0,478 \pm 0,144^{\text{aA}}$
4,85	$0,437 \pm 0,100^{\text{aA}}$	$0,473 \pm 0,196^{\text{aA}}$	$0,414 \pm 0,158^{\text{aA}}$
4,70	$0,475 \pm 0,056^{\text{aA}}$	$0,471 \pm 0,153^{\text{aA}}$	$0,394 \pm 0,203^{\text{aA}}$
4,55	$0,399 \pm 0,066^{\text{aA}}$	$0,369 \pm 0,125^{\text{aA}}$	$0,446 \pm 0,197^{\text{aA}}$

α -Lactoalbumina			
5,00	$0,067 \pm 0,011^{\text{cB}}$	$0,089 \pm 0,012^{\text{aA}}$	$0,093 \pm 0,014^{\text{aA}}$
4,85	$0,084 \pm 0,008^{\text{abA}}$	$0,086 \pm 0,011^{\text{aA}}$	$0,067 \pm 0,001^{\text{bB}}$
4,70	$0,090 \pm 0,007^{\text{aA}}$	$0,082 \pm 0,017^{\text{aAB}}$	$0,062 \pm 0,018^{\text{bB}}$
4,55	$0,071 \pm 0,006^{\text{bC}}$	$0,058 \pm 0,008^{\text{bA}}$	$0,064 \pm 0,011^{\text{bA}}$

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média \pm DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Os valores médios de concentração de β -LG nas diferentes amostras de soro avaliadas variaram entre $0,354 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e $0,478 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, dependendo do tipo de ácido utilizado na coagulação e do pH final do tratamento. Apesar dessa variação numérica, a análise estatística dos dados indicou que não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Isso sugere que, nas condições experimentais adotadas, o tipo de ácido e o pH de acidificação não influenciaram de forma relevante a concentração final de β -LG presente no soro após a separação da massa coalhada.

A β -LG é conhecida por sua estabilidade em soluções ácidas e, embora sua estrutura quaternária seja sensível ao pH, especialmente no intervalo entre 4,0 e 6,0, sua solubilidade e resistência à precipitação durante o processo de coagulação explicam a sua permanência consistente na fase líquida, independentemente das variações de pH e do tipo de ácido utilizado.

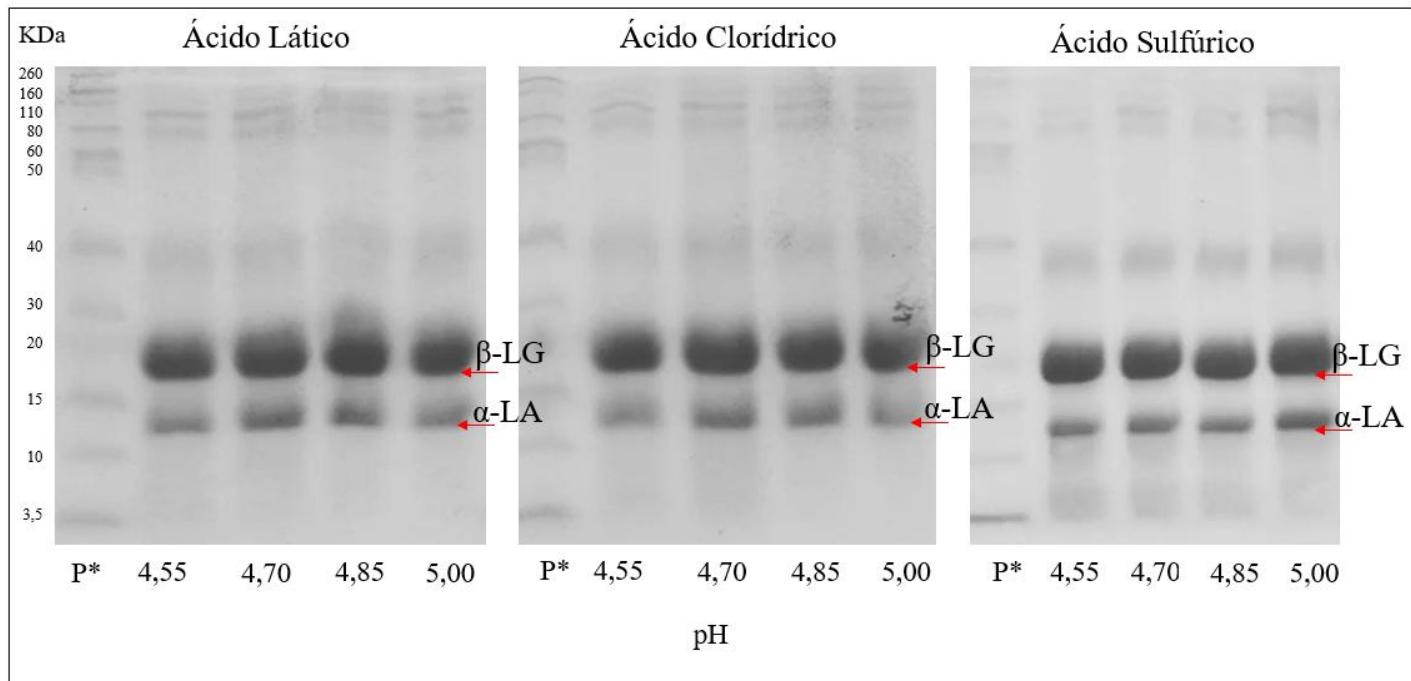
Em contrapartida, os valores médios de α -LA apresentaram maior variabilidade entre os tratamentos. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de α -LA

variaram de $0,058 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nas amostras de soro obtidas com ácido clorídrico em pH 4,55, até $0,093 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nas amostras provenientes da coagulação com ácido sulfúrico em pH 5,00. Neste caso, ao contrário do observado com a β -LG, houve diferença estatística significativa ($P<0,05$) entre os diferentes tratamentos, evidenciando que o pH de acidificação e o tipo de ácido influenciaram a solubilidade e a retenção da α -LA no soro.

Ao analisar os dados, verifica-se uma tendência clara: os menores valores de α -LA foram sistematicamente associados aos tratamentos realizados em pH 4,55, independentemente do ácido utilizado. Isso permite inferir que, nesse valor de pH mais próximo ao ponto isoelétrico das caseínas (aproximadamente pH 4,6), ocorre uma maior interação entre a α -LA e as micelas de caseína durante a formação da coalhada. Como consequência, parte dessa proteína pode ser coagulada junto com a caseína, sendo retida na massa sólida ao invés de permanecer no soro. Esse comportamento é condizente com o conhecimento existente sobre a termodinâmica e a afinidade de associação das proteínas do soro com as caseínas em condições de pH ácido.

Para complementar os dados obtidos por meio da Cromatografia, foi realizada uma análise eletroforética por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Esse método permite visualizar qualitativamente as proteínas presentes nas amostras de soro, por meio da separação com base no peso molecular, e serve como ferramenta adicional para confirmar a presença, ausência ou intensidade relativa das principais frações proteicas. Os resultados dessa análise complementar estão apresentados na Figura 15, permitindo uma correlação visual com os dados quantitativos obtidos por HPLC e reforçando as conclusões sobre o comportamento das proteínas do soro diante das variações de pH e do tipo de ácido utilizado durante a coagulação do leite.

Figura 15 - Eletroforese em gel dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH.



P* - padrão de proteína

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os resultados obtidos estão em conformidade com os valores de massas moleculares das proteínas majoritárias do soro do leite previamente reportados na literatura científica, sendo aproximadamente 18,0 kDa para a β-LG e de 14,0 kDa para a α-LA, conforme descrito por Fox e McSweeney (1998) e corroborado por Velickovic *et al.* (2018). Esses valores são amplamente reconhecidos e servem como referência para a identificação dessas proteínas por técnicas eletroforéticas e cromatográficas.

Além disso, a intensidade e a espessura das bandas observadas nos géis de eletroforese apresentaram correlação direta com os dados obtidos por meio da cromatografia líquida, reforçando a validade dos resultados. Especificamente, foi possível observar que a proteína β-LG aparece com maior intensidade nas bandas, o que está de acordo com sua predominância em termos de concentração relativa no soro do leite, quando comparada à quantidade de α-LA. Este padrão confirma a distribuição natural dessas proteínas, sendo a β-LG a principal fração proteica do soro.

Com base na análise visual das bandas proteicas obtidas nas amostras submetidas a diferentes condições de pH, foi possível inferir que, no pH 4,55, as bandas correspondentes à α-LA apresentaram-se com coloração visivelmente menos intensa em comparação às bandas formadas nos demais valores de pH avaliados. Esse

comportamento foi observado de forma consistente para todas as amostras tratadas com os três diferentes ácidos utilizados no experimento. Tal diminuição na intensidade pode indicar uma menor solubilidade ou estabilidade da α -LA nessa condição de pH, o que influencia sua detecção. Esses achados qualitativos estão em concordância com os resultados quantitativos fornecidos pela técnica de HPLC, a qual também demonstrou uma menor concentração de α -LA no pH 4,55, reforçando a confiabilidade dos dados obtidos por ambas as metodologias analíticas utilizadas para a determinação das proteínas do soro.

5.5 RESÍDUO MINERAL FIXO E CARACTERIZAÇÃO MINERAL DAS CINZAS DO LEITE, MASSA COALHADA E SORO

5.5.1 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral do leite

O RMF médio dos leites reconstituídos utilizados nesse estudo foi de $0,70 \pm 0,01\%$ m/m. Hayden (2023) encontrou valores de minerais variando de 0,48% a 0,85%.

A Tabela 13 mostra os valores médios da composição mineral das cinzas dos leites reconstituídos determinados pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (MEV/EDS).

Tabela 13 - Composição mineral média das cinzas dos leites reconstituídos (mM)* .

Elementos (mM)	Cálcio	Fósforo	Magnésio	Cloro	Potássio	Sódio
Cinzas do Leite	$20,31 \pm 1,88$	$24,58 \pm 1,81$	$2,93 \pm 0,41$	$17,36 \pm 5,88$	$23,28 \pm 5,00$	$11,67 \pm 1,27$

*Resultados expressos em média \pm DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores de minerais determinados nas amostras analisadas neste estudo apresentaram-se inferiores àqueles descritos na Tabela 3 do trabalho de referência elaborado por Gaucheron (2005). Essa discrepância pode ser atribuída a diversos fatores que influenciam significativamente a composição mineral do leite, tais como o estado fisiológico do animal, o tipo e a qualidade da alimentação oferecida ao rebanho, o estágio da lactação, além de variações sazonais e genéticas (Cobo-Angel *et al.*, 2014). Esses fatores são conhecidos por afetar, de maneira direta, a concentração de macro e microminerais no leite, especialmente cálcio, fósforo, potássio e magnésio, componentes

fundamentais tanto para a estabilidade físico-química quanto para as propriedades tecnológicas do leite.

Em relação ao cálcio, especificamente, observa-se uma boa concordância entre os valores obtidos por meio da técnica de MEV/EDS e os valores determinados por meio do método utilizando eletrodo íon seletivo portátil, modelo LAQUAtwin, para a medição de cálcio iônico. Em pH 4,00, a concentração de cálcio medida foi de 21,00 mg/L, indicando uma proximidade relevante com os dados gerados pela análise instrumental por MEV/EDS. Essa semelhança sugere uma consistência entre os métodos de análise aplicados e reforça a confiabilidade dos resultados obtidos, sobretudo no que se refere à quantificação do cálcio em diferentes condições.

5.5.2 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral das massas coalhadas

A Tabela 14 apresenta os valores médios de resíduo mineral fixo (RMF) obtidos nas amostras de massas coalhadas, formadas durante o processo de coagulação ácida do leite reconstituído.

Tabela 14 - Valores médios de RMF das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m)* .

pH	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
5,00	1,12 ± 0,28 ^{aB}	1,31 ± 0,19 ^{aA}	0,94 ± 0,12 ^{aC}
4,85	0,96 ± 0,32 ^{aA}	1,12 ± 0,14 ^{bA}	0,93 ± 0,17 ^{aB}
4,70	1,04 ± 0,19 ^{aA}	1,00 ± 0,20 ^{bA}	0,85 ± 0,05 ^{aB}
4,55	0,87 ± 0,15 ^{bA}	0,88 ± 0,12 ^{cA}	0,82 ± 0,09 ^{aA}

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média ± DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Observou-se uma diferença estatística significativa entre as amostras analisadas quanto aos teores de resíduo mineral fixo (RMF), o que indica que o tipo de ácido utilizado no processo de acidificação, assim como o pH final de coagulação, influenciam diretamente a retenção de minerais na matriz da massa coalhada. De forma específica, nas amostras submetidas à acidificação com ácido clorídrico e ácido lático, foi verificada uma redução significativa nos valores de RMF quando o ponto final de pH foi ajustado

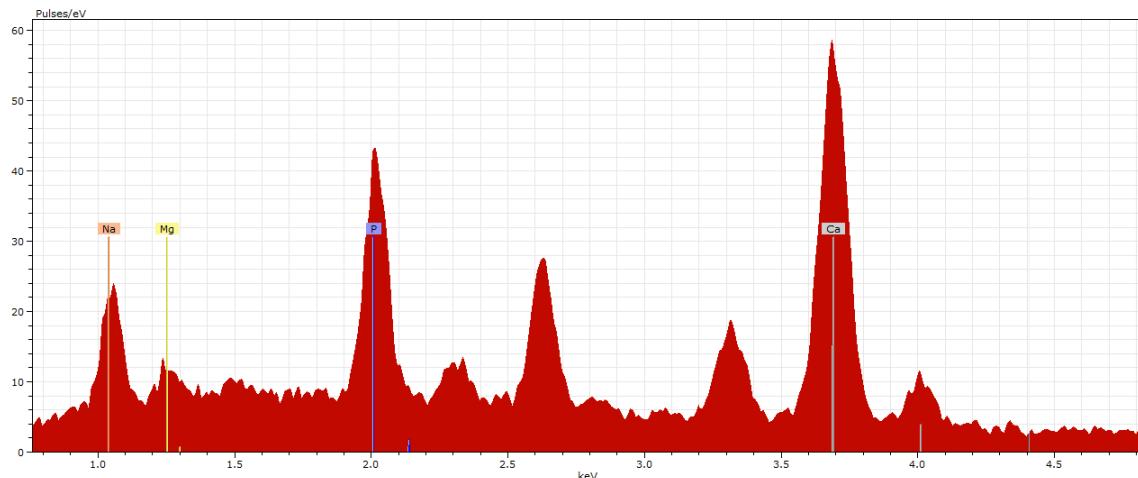
para 4,55, sugerindo que esse nível de acidez favorece a solubilização ou perda de minerais durante a formação da coalhada.

Por outro lado, o comportamento observado nas amostras tratadas com ácido sulfúrico diferiu dos demais. Nesse caso, a variação no pH de coagulação não resultou em diferenças estatisticamente significativas nos valores de RMF, o que sugere que a ação do ácido sulfúrico sobre os componentes minerais do leite pode ser menos sensível às alterações de pH dentro da faixa avaliada. Essa estabilidade pode estar relacionada à natureza do ácido sulfúrico como um agente diprótico forte, que se dissocia completamente em solução, gerando um ambiente ácido uniforme que pode promover a desmineralização de forma mais constante, independentemente do pH.

Além disso, com exceção das amostras acidificadas em pH 4,55, nas demais faixas de pH, observou-se que o uso do ácido sulfúrico resultou, de modo geral, em valores de RMF inferiores quando comparado às amostras submetidas aos mesmos pH com ácido clorídrico ou ácido lático. Esses resultados indicam que o tipo de ácido influencia não apenas a eficiência da coagulação, mas também a retenção dos minerais na coalhada, o que pode ter implicações tecnológicas importantes para a fabricação de derivados lácteos com características nutricionais e funcionais específicas.

O método de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) permitiu a rápida identificação e quantificação da composição dos elementos brutos do leite, da massa coalhada e do soro ácido a partir das cinzas dos mesmos. Os resultados são obtidos conforme ilustrado na Figura 16. Apesar do amplo número de elementos possíveis de serem detectados com esta técnica (SÖGUT *et al.*, 2013), a análise rápida focou nos seguintes elementos: cálcio, fósforo, sódio, magnésio, conforme mostrado na Figura 16.

Figura 16 - Espectro de energia dispersiva de raios X.



Sendo: Ca – cálcio, P – fósforo, Na – sódio e Mg – magnésio.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A Tabela 15 apresenta os valores de média geral, desvio padrão, coeficiente de variação, valor máximo e mínimo dos principais elementos minerais das massas coalhadas gerados com diferentes ácidos e níveis de pH, determinados pela técnica de MEV/EDS.

Tabela 15 - Resumo da concentração média dos principais elementos minerais das massas coalhadas.

Parâmetros gerais	Ca	P	Na	Mg
Média	56,68	90,02	6,27	2,50
Desvio Padrão	15,84	13,73	0,80	0,36
Coeficiente de variação*	28,00	51,00	13,00	15,00
Máximo	93,95	114,06	7,75	3,18
Mínimo	36,45	67,34	5,22	2,10

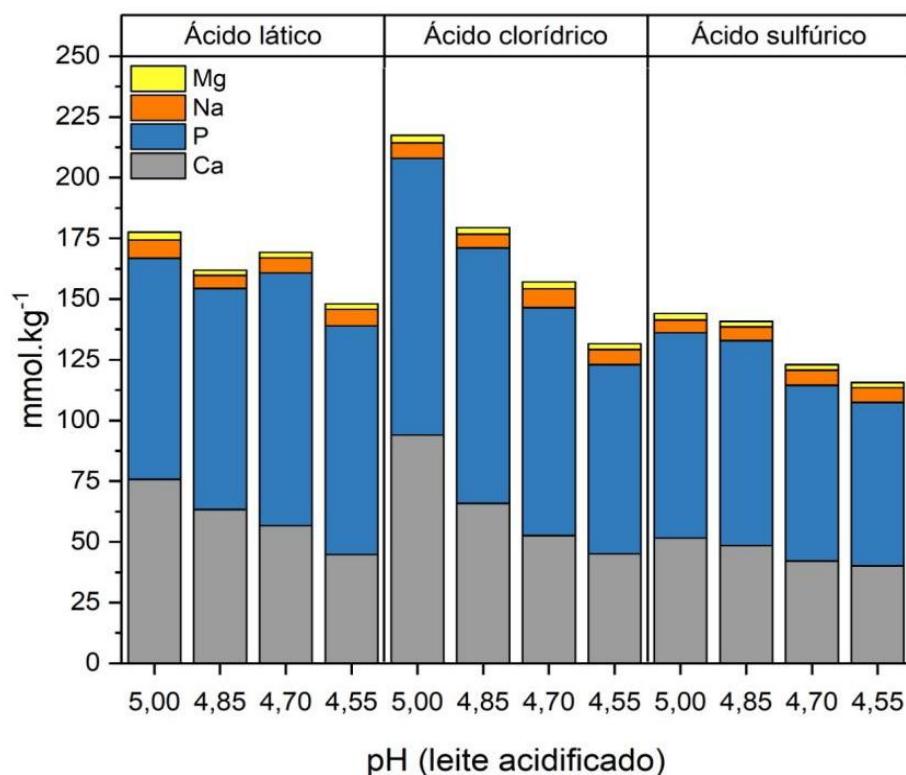
*Resultados expressos em %. Sendo: Ca – cálcio, P – fósforo, Na – sódio e Mg – magnésio.

No geral, é possível observar que o P e o Ca são os principais minerais encontrados nas massas coalhadas, seguido pelo Na e Mg em menores quantidades. A

estrutura das micelas de caseína é formada por ligações de fosfato de cálcio e outras interações entre as submicelas (HORNE, 2006).

A Figura 17 ilustra os valores médios dos principais minerais identificados em maior concentração nas amostras de cinzas das massas coalhadas, obtidas após o processo de coagulação do leite reconstituído com diferentes ácidos e em diferentes valores de pH. A análise foi realizada por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada à Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (MEV/EDS), que permite a caracterização semiquantitativa da composição elementar das amostras sólidas.

Figura 17 - Principais minerais das cinzas das massas coalhadas obtidas no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (mM)*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores médios de concentração de cálcio presentes nas amostras de cinzas obtidas a partir dos soros remanescentes dos diferentes tratamentos de coagulação apresentaram variações expressivas, oscilando entre 22,83 mM nos tratamentos realizados com ácido sulfúrico em pH 4,55, até 61,67 mM nos tratamentos em que se utilizou ácido clorídrico e o pH final foi ajustado para 5,00. Essa diferença reflete a

influência tanto do tipo de ácido empregado quanto do pH de coagulação sobre a liberação ou retenção de minerais no soro.

No caso do fósforo, observou-se uma variação igualmente significativa, com concentrações que foram de 19,67 mM nas amostras tratadas com ácido sulfúrico em pH 4,55 até 57,50 mM nas amostras tratadas com ácido clorídrico em pH 5,00. Esses dados indicam que, à medida que o pH se eleva, há uma maior retenção desses minerais no soro, o que implica uma menor incorporação na matriz da massa coalhada. Tal comportamento está diretamente associado ao estado de ionização dos fosfatos e à sua interação com as proteínas do leite, especialmente a caseína.

Em relação ao sódio, os valores médios das cinzas dos soros variaram entre 34,17 mM, observados nos tratamentos com ácido sulfúrico em pH 4,55, até 52,83 mM, encontrados nos tratamentos com ácido lático em pH 5,00. No entanto, diferentemente dos minerais cálcio, fósforo e magnésio, o sódio não seguiu uma tendência clara de variação com o pH ou com o tipo de ácido utilizado.

Para o magnésio, os valores médios variaram de 22,33 mM nas amostras tratadas com ácido lático em pH 4,85 até 55,33 mM nas amostras submetidas ao tratamento com ácido clorídrico em pH 5,00. Essa variação reforça a ideia de que níveis mais baixos de pH favorecem a desmineralização da fase coloidal do leite, promovendo maior liberação de minerais para o soro e, consequentemente, reduzindo sua concentração na massa coalhada.

De forma geral, os dados indicam que, com exceção do sódio, os minerais cálcio, fósforo e magnésio apresentaram concentrações significativamente menores nos soros das amostras tratadas a pH 4,55, independentemente do tipo de ácido utilizado. Esse padrão confirma a maior desmineralização das micelas de caseína em condições mais ácidas, o que está de acordo com os mecanismos já descritos na literatura, segundo os quais o abaixamento do pH promove a dissociação dos íons cálcio e fosfato da matriz micelar, facilitando sua liberação para a fase líquida.

Na prática industrial, especialmente na fabricação de Requeijão cremoso fundido, esse comportamento tem implicações importantes. Durante esse processo, utilizam-se sais fundentes, como citratos e fosfatos de sódio, cuja principal função tecnológica é sequestrar íons cálcio das micelas de caseína, promovendo a desestabilização das redes proteicas e facilitando a fusão da massa coalhada, resultando em um produto com textura homogênea e característica fundente (Van Dender, 2014). Diante disso, a utilização de um pH mais baixo no momento da acidificação do leite pode representar uma estratégia

tecnológica relevante, uma vez que uma coalhada com menor teor de cálcio estará parcialmente desmineralizada, o que pode potencializar a eficiência dos sais fundentes e melhorar a performance do processo de fusão. Esse fator deve, portanto, ser considerado na formulação e no controle das etapas de processamento de Requeijões e outros produtos derivados do leite que envolvam fusão e emulsificação de proteínas.

5.5.3 Resíduo mineral fixo e caracterização mineral dos soros

A Tabela 16 mostra os valores médios de RMF encontrados nas amostras de soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH.

Tabela 16 - Valores médios de RMF dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (% m/m)*.

pH	Ácido Lático	Ácido Clorídrico	Ácido Sulfúrico
5,00	0,84 ± 0,32 ^{aA}	0,72 ± 0,02 ^{aA}	0,83 ± 0,12 ^{aA}
4,85	0,74 ± 0,05 ^{aA}	0,76 ± 0,01 ^{aA}	0,81 ± 0,08 ^{aA}
4,70	0,86 ± 0,16 ^{aA}	0,78 ± 0,02 ^{aA}	0,78 ± 0,06 ^{aA}
4,55	0,77 ± 0,05 ^{aA}	0,83 ± 0,04 ^{aA}	0,81 ± 0,05 ^{aA}

^{a,b,c}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$);

^{A,B,C}Letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

*Resultados expressos em média ± DP.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Os valores médios de resíduo mineral fixo (RMF) obtidos nas amostras de soro provenientes dos diferentes tratamentos de coagulação variaram dentro de uma faixa relativamente estreita, situando-se entre 0,72% m/m e 0,86% m/m. Esses resultados indicam que, independentemente do tipo de agente acidificante utilizado e da variação no pH final de coagulação do leite, o conteúdo mineral residual presente na fase líquida manteve-se relativamente constante.

De forma semelhante ao que foi observado para os teores de sólidos totais e para β -LG, que é a principal proteína solúvel do soro e representa uma fração significativa das soroproteínas do leite bovino, os valores de RMF também não apresentaram diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos aplicados. Isso sugere que a modificação do pH dentro da faixa estudada, assim como a substituição entre diferentes ácidos, não foi suficiente para provocar alterações substanciais na quantidade total de minerais que permanecem dissolvidos no soro após o processo de coagulação.

A ausência de variação estatística significativa nesses parâmetros pode ser explicada pelo fato de que grande parte dos minerais solúveis no leite, especialmente os não ligados à fase micelar, tende a permanecer na fase líquida após a formação da coalhada, independentemente do agente acidificante.

A Tabela 17 apresenta os valores de média geral, desvio padrão, coeficiente de variação, valor máximo e mínimo dos principais elementos minerais dos soros gerados com diferentes ácidos e níveis de pH, determinados pela técnica de MEV/EDS.

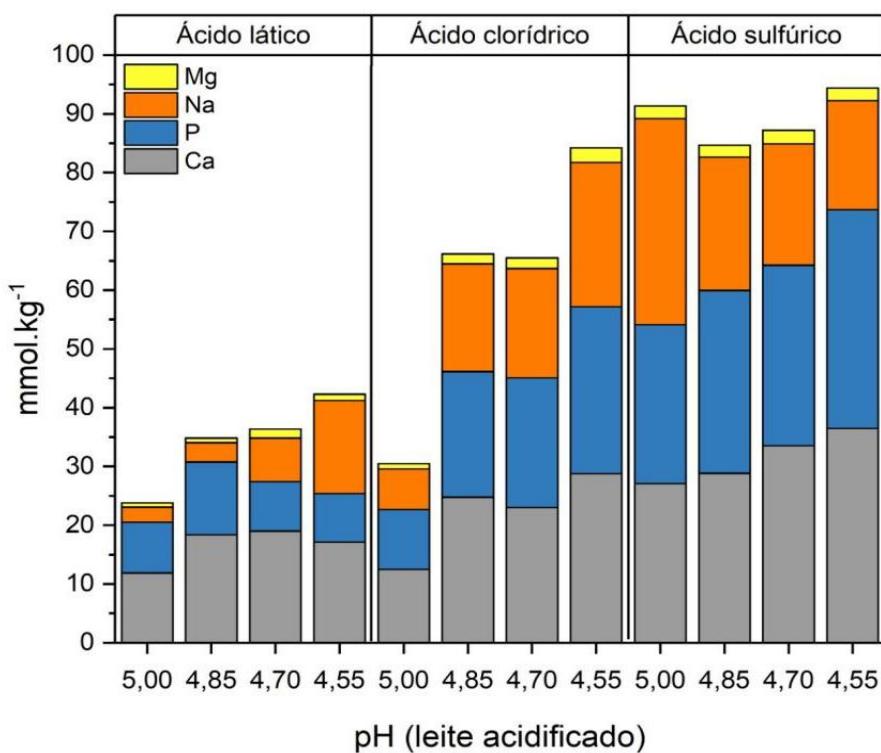
Tabela 17 - Resumo da concentração média dos principais elementos minerais dos soros ($\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Parâmetros gerais	Ca	P	Na	Mg
Média	23,44	20,49	16,20	1,63
Desvio Padrão	7,88	10,49	9,64	0,64
Coeficiente de variação*	34,00	51,00	59,00	39,00
Máximo	40,09	37,23	35,11	2,50
Mínimo	11,89	8,29	2,55	0,69

*Resultados expressos em %. Sendo: Ca – cálcio, P – fósforo, Na – sódio e Mg – magnésio.

A Figuras 18 mostra os valores médios dos minerais encontrados em maiores quantidades nas amostras de cinzas dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH pela técnica MEV/EDS.

Figura 18 - Principais minerais das cinzas dos soros obtidos no processo de coagulação com diferentes ácidos e diferentes pH (mM)*.



*Resultados expressos em média.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Embora os valores médios de resíduo mineral fixo (RMF) obtidos nas amostras de soro não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas entre si, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas na distribuição específica dos minerais presentes nas cinzas dessas amostras. Ou seja, embora a quantidade total de minerais tenha permanecido relativamente constante, a composição qualitativa e quantitativa dos elementos minerais individuais variou de forma relevante em função tanto do tipo de ácido aplicado quanto do pH final de acidificação do leite.

No que diz respeito ao cálcio, os valores médios encontrados nas cinzas dos soros variaram de 23,00 mM nas amostras submetidas ao tratamento com ácido clorídrico em pH 5,00, até 48,17 mM nas amostras tratadas com ácido sulfúrico em pH 4,55. Essa diferença sugere uma maior liberação de cálcio das micelas de caseína para a fase líquida sob condições mais ácidas e na presença de ácido sulfúrico, que pode promover uma desmineralização mais intensa da matriz proteica.

Em relação ao fósforo, também foi observada uma ampla variação nos valores médios, que oscilaram entre 23,17 mM nas amostras tratadas com ácido clorídrico em pH 5,00 e 51,33 mM nas amostras tratadas com ácido sulfúrico em pH 5,00. Esse comportamento pode ser atribuído à dissociação de fosfatos coloidais sob influência de diferentes ácidos, o que resulta em níveis distintos de fósforo solúvel nas cinzas do soro.

O sódio, por sua vez, apresentou valores médios bastante variáveis, indo de 15,50 mM nas amostras obtidas com ácido lático em pH 4,55 até 53,17 mM nas amostras tratadas com o mesmo ácido e pH, o que pode sugerir inconsistências na origem do sódio.

Já os valores médios de magnésio variaram de 20,00 mM nas amostras tratadas com ácido clorídrico em pH 5,00 a 49,83 mM nas amostras tratadas com ácido sulfúrico em pH 4,55. Assim como o cálcio, o magnésio também é um cátion bivalente que interage com a estrutura micelar da caseína, e sua liberação para o soro pode ser intensificada em condições mais ácidas e na presença de ácidos fortes, como o sulfúrico.

De modo geral, as amostras de cinzas dos soros obtidas a partir do processo de coagulação do leite com ácido sulfúrico apresentaram concentrações mais elevadas dos principais minerais analisados quando comparadas com aquelas obtidas por meio da acidificação com ácido clorídrico ou ácido lático. Esses resultados indicam que o ácido sulfúrico possui maior capacidade de promover a liberação desses minerais para a fase líquida durante a coagulação ácida, possivelmente em razão de sua maior força iônica, que contribui para a dissociação dos minerais ligados à estrutura proteica. Essa diferença na distribuição mineral pode ter implicações tecnológicas e nutricionais importantes, principalmente no aproveitamento do soro como subproduto e na formulação de produtos lácteos com composição mineral específica.

6 CONCLUSÃO

O processo de obtenção da massa coalhada pela acidificação do leite frio possibilita a automação da fabricação em uma operação contínua para a fabricação de Requeijão.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível verificar que o teor de cálcio iônico no leite é influenciado pelo abaixamento do pH, sendo que os ácidos clorídrico e sulfúrico proporcionam uma maior liberação de cálcio da fase coloidal para a fase solúvel.

O pH de acidificação do leite influenciou no tempo e temperatura de início de coagulação. Quanto menor o pH, mais rápido e em menor temperatura o leite começa a coagular.

As fabricações com ácidos sulfúrico e clorídrico em pH 4,55 tiveram um maior rendimento ajustado em kg de massa/100 kg de leite. Entretanto a acidificação com ácido sulfúrico proporcionou maiores perdas na produção.

O pH de acidificação do leite influenciou no pH, na umidade e nas características físicas das massas coalhadas. As massas coalhadas dos tratamentos pH 4,55 com ácido clorídrico e ácido sulfúrico apresentaram umidade mais alta e uma maior recuperação dos constituintes sólidos do leite para a massa.

Os soros obtidos nos tratamentos com ácido clorídrico apresentaram maiores valores de cálcio iônico e cálcio iônico em pH 4,00.

O pH de acidificação do leite influenciou no pH e nas características físicas dos soros. Os soros com valores menores de pH, apresentaram-se menos opacos, mais esverdeados e translúcidos, tendo relação com o tamanho das partículas das amostras.

O pH e ácido utilizado na acidificação do leite não influenciou nas concentrações de β -Lactoglobulina, entretanto, no pH 4,55 com ácido clorídrico os valores de α -Lactoalbumina foram menores, podendo inferir que ocorreu uma maior associação dessa proteína com as caseínas da massa coalhada.

Na caracterização mineral das amostras de cinzas das massas coalhadas, houve diferença estatística significativa entre as amostras. Com exceção do sódio que não seguiu a mesma tendência, os valores de cálcio fósforo e magnésio foram menores no pH 4,55 nos três ácidos utilizados.

O pH de acidificação do leite influenciou na distribuição mineral das amostras de cinzas dos soros. As amostras obtidas pelo processo de acidificação do leite com ácido sulfúrico apresentaram maiores valores de cálcio, fósforo e magnésio.

Sendo assim, a produção de massa coalhada utilizando ácido clorídrico para abaixamento do pH até 4,55, proporcionou maior liberação de cálcio da fase coloidal para a fase solúvel, início da coagulação mais rápido, maiores rendimentos e aproveitamento dos constituintes do leite na massa coalhada com menos perdas de processo, maior liberação de cálcio no soro, fazendo com que a massa coalhada fique com menos cálcio e consequentemente melhorando o processo de fusão e um maior aproveitamento das proteínas do soro na massa coalhada.

REFERÊNCIAS

ABIQ – Associação Brasileira das Indústrias De Queijo. Histórico da Evolução do Mercado Brasileiro de Queijos. São Paulo: ABIQ, 2019. Disponível em: <http://www.abiq.com.br>. Acesso em: 22 out. 2023.

ANTONOV, Y. A.; MOLDENAERS, P.; CARDINAELS, R. Complexation of lysozyme with sodium caseinate and micellar casein in aqueous buffered solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p.102-118, jan., 2017.

ANTUNES, A. J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: Manole, p. 136, 2003.

AOAC - ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. Official methods of analysis. Washington (D.C), 2005.

ARAÚJO, L. B. M. Ácido clorídrico; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilescola.uol.com.br/quimica/Acido-cloridrico.htm>. Acesso em: 24 de outubro de 2023.

BALDASSO, C. Fracionamento dos componentes do soro de leite através da tecnologia separação por membranas. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas. Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, p. 44-57, 2001.

BASTOS, R. A.; PINTO, S. M.; CARNEIRO, J. D. D. S.; de MELO RAMOS, T.; de MELO RAMOS, F.; HADDAD, F. F. Avaliação de percepção e preferência dos consumidores em relação a queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 390, p. 12-19, 2013.

BATISTA, F. E. R.; SILVEIRA, A. C. A.; SANGLARD, D. A.; LIMA, W. J. N.; DE CARVALHO MESQUITA, B. M. A. Tecnologias cromatográficas para aproveitamento de soros de leite e purificação de proteínas. **Livros da Editora Integrar**, p. 49-57, 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 94, de 18 de setembro de 2020. Regulamento Técnico que fixa os padrões de Identidade e qualidade para o soro de leite e o soro de leite Ácido. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico que fixa a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário-LANAGRO/RS. Laboratório de Produtos de Origem Animal. **Determinação do Resíduo Mineral Fixo em Leite e Derivados Lácteos.** RS, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento e da Secretaria de Vigilância de Vigilância Sanitária. **Nova legislação comentada de produtos lácteos.** Brasília: DF, p. 237, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão Cremoso ou Requesón.** Portaria nº 359 de 04 de novembro de 1997. Brasília, 1997.

CARVALHO, K. D. **Utilização de soro de leite doce na fabricação de sorvete de massa.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável e Qualidade de Vida) - Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – FAE, São João da Boa Vista, 2013.

CHAVEZ, M. S.; NEGRI, L. M., TAVERNA, M. A.; CUATRÍN, A.. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 201-206, 2004.

CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L., LORIENT, D. **Proteínas alimentarias.** Bioquímica – Propiedades funcionales – valor nutricional – Modificaciones químicas. Traducido del original francés por el Dr. Francisco López Capont. Zaragoza – Espanha: Editorial ACRIBIA SA, 1989.

COBO-ANGEL, C.; WICHTEL, J.; CEBALLOS-MÁRQUEZ, A. Selenium in milk and human health. **Animal Frontiers**, v. 4, n. 2, p. 38-43, 2014.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micellesd-Review and possible improvements. **Soft Matter**, 7, 2265e2272, 2011.

DATTA, R. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DAXIA. O consumo de queijos no Brasil. 2022. Disponível em:
<https://www.daxia.com.br/o-consumo-de-queijos-no-brasil/> Acesso em: 22 de novembro de 2023.

DIÁRIO AGRÍCOLA, AgroPlanning. Catupiry analisa o consumo de Requeijão no Brasil, 2022. Disponível em: <https://www.agroplanning.com.br/2022/04/28/catupiry-analisa-o-consumo-de-requeijao-no-brasil/> Acesso em: 10 de novembro de 2023.

DIAS, J.A; ANTES, F.G. **Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru.** Porto Velho: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 2014.

DI LUCCIA, A.; ADDEO, F.; CORRADINI, C.; MARIANI, P. Bovine kappa-casein c: an electrophoretic study. **Scienza E Technica Lattiero-casearia**, v.39, p.413-422, 1988.

FONSECA, L. F. L; SANTOS, M. V. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri, SP: Ed. Manole; 314p 2007.

FERNANDES, A. G.; VALLE, J. L. E.; CAMPOS, S. D. S.; MORI, E. E. M. Formulação de sais emulsificantes para a elaboração de queijão cremoso e outros tipos de queijos fundidos. Parte II. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v.40, n.237, p.27-39, 1985.

FERNANDES, A. G.; MARTINS, J. F. P. Fabricação de queijão cremoso a partir de massa obtida por precipitação ácida à quente do leite de búfala e de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.212, p.7 -13, 1980.

FERREIRA, V. R. Ácido Sulfúrico; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilescola.uol.com.br/quimica/acido-sulfurico.htm>. Acesso em: 24 de outubro de 2023.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1^a edição. Thomson Science: Londres, Inglaterra, p. 478, 2009.

FOX, P. F.; MCSWEENWEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Blackie Academic & Professional, p. 478, 1998.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v.18, p.677-684, 2008.

FRANCOLINO, S. LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; IEZZI, R.; MUCCHETTI, G. Use of milk protein concentrate to standardize milk composition in Italian citric Mozzarella cheese making. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 310–314, 2010.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 297 p. 1991.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p.473-483, 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. UFRGS: Porto Alegre, p.31-47, 2003

GONZÁLEZ, F. H. D; DÜRR, J. W; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, p. 68, 2001.

HARDING, F. Compositional quality. In: Harding, F. (Ed.). Milk quality. London: Chapman & Hall, p. 3-23, 1995.

HAYDEN, V. R. **Composição físico-química do leite de vacas na região de Parintins/AM.** Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Zootecnia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, 2023.

HERREMAN, L.; NOMMENSEN, P.; PENNINGS, B.; LAUS, M. C. Comprehensive overview of the quality of plant-and animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. **Food Science Nutrition**, v.8, n.10, p.5379-5391, 2020.

HORNE, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v.11, p.148-153, 2006.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine-milk. I. Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, v.48, p. 273-284, 1981.

HURLEY, W L. Lactose synthesis. Lactation Biology. **Department of Animal Sciences**. University of Illinois. 1999.

JAISWAL, K.; SARSAVAN, A. Detection of single nucleotide polymorphism by T-ARMS PCR of cross bred cattle Karan Fries for A1, A2 beta casein types. **International Journal of Biological Sciences Research**, v.1, p.18-20, 2014.

JELINSKA, M.; BIAŁEK, A.; GIELECIŃSKA, I.; MOJSKA, H.; TOKARZ, A. Impact of conjugated linoleic acid administered to rats prior and after carcinogenic agent on arachidonic and linoleic acid metabolites in serum and tumors. **Journals e Books**, v.126, p.1-8, 2017.

JOSEPHSON, R. V.; MAHESWARAN, S. K.; MORR, C. V.; JENNESS, R.; LINDORFER, R. K.. Effect of urea on pI's of ampholytes and casein in isoelectric focusing, **Anal Biochem**, v.40, p.476-493, 1971.

KHALESI, M.; CERMENÓ, M.; FITZGERALD, R. J. Contribution of whey protein denaturation to the in vitro digestibility, biological activity and peptide profile of milk protein concentrate. **Journal of Functional Foods**, v.104, 2023.

KNIGHT, C. H.; FRANCE, J.; BEEVER, D. E. Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. **Livestock Production Science**, v.39, p.129-137, 1994.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.785-796, 2004.

KRISSANSEN, G. W. Propriedades emergentes para a saúde das proteínas do soro de leite e suas implicações clínicas. **Jornal do Colégio Americano de Nutrição**, v.6, p.713S-723S, 2007.

KUMAR, R.; CHAUHAN, S. K.; SHINDE, G.; SUBRAMANIAN, V.; NADANASABAPATHI, S. Whey Proteins: A potential ingredient for food industry-A review. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, 37(4), 283-290, 2018.

LARSON, B. L. Ed. Lactation. Ames, Iowa State University Press, Ames, p. 267, 1985.

LARSON, B. L. Lactation, a comprehensive treatise Vol. II. Academic Press Inc., New York, p. 458, 1978.

LAW, B. A., TAMIME, A. Y. Technology of Cheesemaking. John Wiley & Sons, 2 Ed., 2010.

LIN, M. J.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. G. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.59, n.3, p.192-199, 2006.

MAGANHA, M. F. B. Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos – Série P+L. São Paulo: CETESB, p.89, 2006.

MARGOLIES, B.; ADAMS, M. C.; PRANATA, J.; GONDOUTOMO, K.; BARBANO, D. M. Effect of uncertainty in composition and weight measures in control of cheese yield and fat loss in large cheese factories. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6822-6852, 2017.

MARQUES, F. G.; DUARTE, I. P. Comparação em métodos para determinação de umidade em queijos: método tradicional e balança determinadora de umidade por infravermelho. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 4, n. 1, 2015.

MATHIEV, J. Comportamiento físico-químico de la leche mantenida a baja temperatura. **Revista Española de Lacheria**, n.1, p. 33-37, 1985.

MELO, I. H. S. **Qualidade microbiológica e físico-química do leite em fazendas e postos de refrigeração na região sudoeste do estado de Minas Gerais**, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. 2022.

MEPHAN, T. B.; GAYE, P.; MARTIN, P.; MERCIER, J. C. Biosynthesis of milk protein. In: Fox, P.F. (Ed.). Advanced dairy chemistry – Proteins. London, Elsevier Applied Science, v.1, p.457-491, 1992.

MEZZOMO, T. R. **Peptídeos obtidos da caseína bovina: produção e benefícios à saúde**. AYA Editora, 2023.

MIZUTA, A. G.; SILVA, J. F.; MADRONA, G. S. Tecnologias convencionais e emergentes aplicadas no processamento de bebidas à base de soro de leite: uma revisão. **Revista Principia**, v.60, n.3, p.993-1002, 2023.

MOZURAITYTE, R.; BERGET, I.; MAHDALOVA, M.; GRONBERG, A.; OYE, E. R.; GREIFF, K. Sodium reduction in processed cheese spreads and the effect on physicochemical properties. **International Dairy Journal**, v.90, p.45-55, 2019.

MÜLLER, T.; REMPEL, C. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil– parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 9, n. 3, p. 122-129, 2021.

MÜLLER-BUSCHBAUM, P. et al. Effect os calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. **Biophysical Journal**, v.93, n.3, p.960-968, 2007.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais do II Sul - Leite.** Maringá: UEM, 2002.p 206-217, 2002.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: Fundamentos Tecnológicos.** Campinas: Ícone, 1986.

ORDONÉZ, J. A. **Tecnología de alimentos: Componentes dos alimentos e processos.** Porto Alegre, v. 1, p. 294, 2005.

PADILLA DOVAL, J; ZAMBRANO ARTEAGA, J. C. Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 16, n. 3, p. 62-95, 2021.

PERRONE, I. T.; PEREIRA, J. P. F.; MAGALHÃES, F. A. R.; JÚNIOR, L. C. G. C.; DE PAULA, J. C. J.; SOBRAL, D. Determinação da composição e do rendimento do queijo Prato obtido a partir do leite concentrado por evaporação a vácuo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 376, p. 35-41, 2010.

RAPACCI, M. **Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta.** Campinas: Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Alimentar da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em tecnologia de alimentos, 1997.

RÄSÄNEN, E.; NYSTRÖM, M.; SAHLSTEIN, J.; TOSSAVAINEN, O. Comparison of commercial membranes in nanofiltration of sweet whey. **Lait.**, n.82, p.343-356, 2002.

REBOUILLAT, S.; ORTEGA-REQUENA, S. Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.6, p.176-203, 2015.

ROCHA, L. O. F. **Utilização de soro lácteo, goma xantana e amido modificado na elaboração de doce de leite com café.** 2013. 204 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras: UFLA, 2013.

RODRIGUES, L. R. M. **Valorização da fração protéica do soro de queijo.** 2001. 197 p. Dissertação (Mestrado em biologia) - Faculdade em Engenharia biológica, Universidade do Minho de São Paulo, São Paulo, UMSP, 2001.

SALES, D. C.; RANGEL, A. H. D. N.; URBANO, S. A.; BORGES, K. C.; ANDRADE NETO, J. C. D.; CHAGAS, B. M. E. Cheese yield in Brazil: state of the art. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 563–569, 2016.

SCOTT, R.; ROBBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso.** 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2002.

SGARBIERI, V. C. Review: structural and physicochemical properties of milk proteins **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, p.43-56, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo – SP: Livraria Varela, 1996.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. D. S.; CARVALHO, A. F. D.; GAUCHERON, F. Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v 22, n.201, p.81-85, 2019.

SINGH, J.; PRAKASH, S.; BHANDARI, B.; BANSAL, N. Ultra high temperature (UHT) stability of casein-whey protein mixtures at high protein content: Heat induced protein interactions. **Food Research International**, v. 116, p. 103-113, 2019.

SINGH, H. Heat-stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.111-119, 2004.

SOBRAL, D.; CHEMINAND E PAULA, M. M.; DE PAULA, J. C. J.; COSTA, R. G. B.; TEODORO, V. A. M. Derretimento de queijão culinário fabricado com proteína concentrada do leite. **Revista Indústria de Laticínios**, n. 136, p.90-93, 2019.

SOUZA, L. A. Força ácida. Mundo educação, 2023. Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/quimica/forca-acida.htm>. Acesso em: 24 de outubro de 2023.

SUNKESULA, V.; KOMMINENI, A.; MELETHARAYIL, G. H.; MARELLA, C.; METZGER, L. E. Short communication: Effect of pH on the heat stability of reconstituted reduced calcium milk protein concentrate dispersions. **Journal Dairy Science**, v.104, n.1, p.134-137, 2021.

STEIJNS, J. M.; HOOJDONK, A. C. M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. **British Journal of Nutrition**, v.84, n.S1, p.11-17, 2000.

TREVISAN, A. P. Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise em leite pasteurizado. (Dissertação) Mestrado em Ciência e tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, p.60, 2008.

TSABOURI, S.; DOUROS, K.; PRIFTIS, K.N. Cow's Milk Allergenicity. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - **Drug Targets**, v.14, p.16-26, 2014.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.167–173, 2007.

VAN DENDER, A. G. F. Requeijão Cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de Fabricação, Controle do Processo e Aspectos de mercado. 2º ed. Revisada e ampliada. São Paulo: setembro Editora, 2014.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2006.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Editorial Acribia (Zaragoza), p. 474, 1995.

VELICKOVIC, T.C.; STANIC-VUCINIC, D.; AL-HANISH, A.; MIHAILOVIC, J.; PRODIC, I.; MINIC, S.; MILCIC, M. Delivery of Epigallocatechin-3-Gallate by Bovine Alpha-Lactalbumin Based on Their Non-covalent Interactions. **Reference Module in Food Science**, p.1-7, 2018.

VIDAL, A. M. C., SARAN NETTO, A. Obtenção e processamento do leite e derivados. Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2018.

VISHNU, C.; SEENAYYA, G.; REDDY, G. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using Lactobacillus amylophilus GV6. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.18, p 429-433, 2002.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. Dairy chemistry and physics. **Nova York: John Wiley e Sons**, 2006.