

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAÍS CARDOSO

ESTUDO DA ACIDIFICAÇÃO DIRETA NA PRODUÇÃO DE MODELOS DE
QUEIJO CREMOSO PELO ÁCIDO LACTOBIFÍICO E ÁCIDO LÁTICO

CURITIBA

2021

TAÍS CARDOSO

ESTUDO DA ACIDIFICAÇÃO DIRETA NA PRODUÇÃO DE MODELOS DE
QUEIJO CREMOSO PELO ÁCIDO LACTOBIÔNICO E ÁCIDO LÁTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos do Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná,
como requisito à obtenção do título de Doutora em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Masson
Coorientador: Dr. João Luiz Andreotti Dagostin

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C268e Cardoso, Taís

Estudo da acidificação direta na produção de modelos de requeijão cremoso pelo ácido lactobiónico e ácido láctico [Recurso eletrônico] / Taís Cardoso. – Curitiba, 2021.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2021.

Orientador: Maria Lúcia Masson.

Coorientador: João Luiz Andreotti Dagostin.

1. Antioxidantes. 2. Agentes antiinfeciosos. 3. Lactose. I. Universidade Federal do Paraná. II. Masson, Maria Lúcia. III. Dagostin, João Luiz Andreotti. IV. Título.

CDD: 572.565

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **TAIS CARDOSO** intitulada: **ESTUDO DA ACIDIFICAÇÃO DIRETA NA PRODUÇÃO DE MODELOS DE QUEIJO CREMOSO PELO ÁCIDO LACTOBIÔNICO E ÁCIDO LÁTICO**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA LUCIA MASSON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica
04/09/2021 22:19:30.0
MARIA LUCIA MASSON
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
03/09/2021 18:45:36.0
FELIPE RICHTER REIS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
13/09/2021 16:55:25.0
MARINA TOLENTINO MARINHO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica
06/09/2021 11:00:08.0
ALESSANDRO NOGUEIRA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica
03/09/2021 18:19:58.0
KATIUCHIA PEREIRA TAKEUCHI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sebastião Cardoso e Margareth Wolff Cardoso, pelo apoio incondicional, por não medirem esforços em prol da minha educação. Agradeço por estarem comigo em todos os momentos, pelo incentivo e por cada palavra de consolo e carinho. Aos meus irmãos, Bruno Cardoso e Rodrigo Cardoso e cunhadas Bruna Klemtz e Camila Hansen, que sempre torceram por mim e estiveram ao meu lado. Agradeço ao meu marido, Alysson Stiegler Ribeiro, pelo companheirismo e suporte diário nessa fase final. Agradeço a minha colega de laboratório Michele Cruz pela paciência diária, conversas e conselhos. Agradeço a minha orientadora, Maria Lucia Masson, pela oportunidade, pela atenção, disponibilidade e por acreditar em mim. Ao meu coorientador, João Luiz Andreotti Dagostin, por todos os ensinamentos e suporte durante a realização desta pesquisa. À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade concedida de modo a contribuir para minha formação acadêmica. E por fim, ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Ciências Científicas e Desenvolvimento Tecnológico - CNPq - Brasil. Essa conquista não é apenas minha! Gratidão!

RESUMO

Compostos derivados da lactose podem ser obtidos e aplicados em diversas áreas, como é o caso do ácido lactobiônico (LBA). A configuração química do LBA evidencia propriedades potenciais, dentre as quais se destacam o poder antioxidante, a atividade antimicrobiana e a ação quelante de metais. No entanto, há escassez de estudos sobre o LBA e suas propriedades. Na área de alimentos as pesquisas ainda são limitadas, pois o LBA não passou por avaliação de segurança quanto ao seu consumo por seres humanos. Porém, o uso do seu sal é regulamentado pelo Food and Drug Administration (FDA). O presente estudo tem como objetivo determinar algumas propriedades do LBA, cujas características são interessantes para seu uso como aditivo em alimentos, e estudar sua influência nas propriedades de um modelo de requeijão cremoso quando em substituição e/ou combinação com ácido láctico na sua produção. A acidificação do modelo de requeijão cremoso foi avaliada por meio das propriedades finais do produto, sendo elas: atividade de água, propriedades de textura, capacidade antioxidante (ABTS e FRAP), atividade antimicrobiana e capacidade quelante sobre os íons Fe^{2+} e Ca^{2+} . A capacidade antioxidante atingiu uma inibição de 56 % para a solução de LBA. A capacidade quelante do íon ferro chegou a 54 % dos íons quelados, enquanto os íons cálcio atingiram 15 %. Os resultados revelaram alto potencial de aplicação de LBA para inibição microbiana e retenção de umidade. Quando aplicado na produção de modelos de requeijão cremoso, as formulações contendo 2 % de ácido lactobiônico apresentaram resultados mais próximos ao requeijão cremoso comercial. Seis amostras contendo 2 % de LBA e ácido láctico foram testadas quanto à atividade antioxidante e quelante, confirmando a formulação G (20 minutos de incubação a 32 °C), como a melhor formulação, com resultados superiores as demais amostras testadas. Os modelos produzidos por meio da mistura de agentes acidificantes foram avaliados e a formulação contendo 100 % LBA apresentou a máxima atividade antioxidante, sendo este valor 88 %. Com as atividades antioxidantes, antimicrobianas e quelantes aqui comprovadas, fica claro que o LBA pode ser mais que um ácido orgânico conservador de alimentos, podendo agir como enriquecedor dentro da matriz alimentícia. Estudos adicionais sobre a aplicação de LBA em produtos alimentícios devem ser conduzidos para melhor compreender a contribuição desse composto nas matrizes orgânicas.

Palavras-chave: quelante de metais; antioxidante; antimicrobiano; propriedades reológicas.

ABSTRACT

Lactose-derived compounds can be obtained and applied in several areas, such as lactobionic acid (LBA), obtained by oxidation of lactose with bromine. The chemical configuration of LBA shows potential properties, among which stand out the antioxidant power, antimicrobial activity and metal chelating action. However, there are few studies on LBA and its properties. In the field of food, studies are still limited. Although the LBA has not been safely evaluated for human consumption. The use of its salt is regulated by the Food and Drug Administration (FDA). The present study aims to determine some LBA properties whose characteristics are interesting for use as a food additive, and to study the effects on the properties of the cream *requeijão* model when in substitution and / or combination with lactic acid in its production. The acidity of the cream *requeijão* model was evaluated by the final properties of the product, namely: water activity, water retention capacity, texture properties, antioxidant capacity (ABTS and FRAP), antimicrobial activity and chelating capacity on ions Fe^{2+} e Ca^{2+} . The antioxidant capacity reached a maximum inhibition of 56 % for LBA solution. Iron ion chelating capacity reached 54 % of chelated ions, while calcium ions reached 15 %. The results revealed high potential of LBA application for microbial inhibition and moisture retention. When applied in the production of cream cheese, the formulations containing 2 % acid presented closer results, in terms of pH, syneresis and water activity, to the commercial cream cheese. The six samples containing 2 % LBA and lactic acid were tested for antioxidant and chelating activity, confirming formulation G (20 minutes incubation at 32 °C) as the best formulation, with results superior to the other samples. The models produced by mixing acidifying agents were evaluated and the formulation containing 100 % LBA showed the maximum antioxidant activity, this value being 88 %. With the antioxidant, antimicrobial and chelating activities proven here, it is clear that LBA can be more than an organic acid preserving food, and can act as an enricher within the food matrix. Additional studies on the application of LBA in food products should be conducted to better understand the contribution of this compound in organic matrices.

Keywords: metal chelator; antioxidant; antimicrobial; rheological properties.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LBA	18
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LÁTICO.....	25
FIGURA 3 – DIAGRAMA CONCEITUAL DO ESTUDO	41
FIGURA 4 – ANÁLISES REALIZADAS COM O LBA (ETAPA 1)	42
FIGURA 5 – ANÁLISES REALIZADAS COM O MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO (ETAPA 2)	42
FIGURA 6 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO DURANTE PERÍODO DE ARMAZENAMENTO (ETAPA 3).....	43
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO DO MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	44
FIGURA 8 - COR INSTRUMENTAL DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO.....	70
FIGURA 9- VARIAÇÃO DE COR DAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO AO LONGO DOS 22 DIAS DE ARMAZENAMENTO	85
FIGURA 10- SINÉRESE DAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PATENTES RELACIONADAS AO LBA	20
TABELA 2 – PROPRIEDADES DO LBA.....	22
TABELA 3 – ESTUDOS RECENTES DA APLICAÇÃO DO LBA EM ALIMENTOS	23
TABELA 4 – ESTUDOS RECENTES APLICADOS A MODELOS DE QUEIJO E REQUEIJÃO	29
TABELA 5 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL INTEIRAMENTE CASUALIZADO PARA ESTABELER A INFLUÊNCIA DE TRÊS PARÂMETROS NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO (ETAPA 2).....	45
TABELA 6 – FORMULAÇÃO DO MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	46
TABELA 7 – PLANEJAMENTO SIMPLEX CENTRÓIDE AUMENTADO PARA MISTURA DE COMPONENTES	46
TABELA 8 – VOLUMES NECESSÁRIOS DOS COMPONENTES PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DO EXTRATO E AMOSTRA EM ESTUDO (Fe^{2+}).....	54
TABELA 9 – ADSORÇÃO PARA AMOSTRA DE LBA.....	57
TABELA 10 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO LBA: RESULTADOS DADOS EM % E CONCENTRAÇÃO EM EQUIVALENTE TROLOX (TE).....	60
TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE LBA EM DIFERENTES PATÓGENOS	63
TABELA 12 – UMIDADE E pH PARA MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO.....	66
TABELA 13 – AW PARA MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO	67
TABELA 14 –MEDIDA INSTRUMENTAL DE COR PARA MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO	69
TABELA 15 – SINÉRESE DAS FORMULAÇÕES DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADAS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO	72
TABELA 16 – REOLOGIA DAS FORMULAÇÕES DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADAS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO	74

TABELA 17 – CAPACIDADE QUELANTE DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	75
TABELA 18 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	78
TABELA 19 – UMIDADE, PH, AW, CINZAS E CLORETOS DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	81
TABELA 20 – ACIDEZ E MEDIDA INSTRUMENTAL DE COR DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	83
TABELA 21 – VISCOSIDADE DO MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO (η mPa•s) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM REFRIGERADO (2.2 °C).....	86
TABELA 22 – ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA n PELO MODELO DE OSTWAL-DE - WAELE	87
TABELA 23 – ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA).....	90
TABELA 24 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUELANTE DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	92
TABELA 25 – CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	95

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico
AHAs	Alfa-hidroxi ácido
AMP	Peptídeos antimicrobianos
AOAC	Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists International
ATCC	American Type Culture Collection
aw	Atividade de água
BHA	Butil Hidroxianisol
BHT	Butil Hidroxitolueno
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
HTST	High Temperature Short Time
GOS	Galacto-oligossacarídeos
LBA	Ácido Lactobiônico
MM	Massa Molar
MMPs	Enzima Metaloproteinase de matriz
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Potencial hidrogeniônico de um ácido
RNA	Ácido ribonucleico
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
UFC	Unidades Formadoras de colônia
UR	Umidade Relativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1	LACTOSE E SEUS DERIVADOS	17
3.1.1	Ácido Lactobiônico.....	17
3.1.1.1	Aspectos químicos e funcionais.....	17
3.1.1.2	Obtenção e comercialização.....	18
3.1.1.3	Patentes.....	19
3.1.1.4	Regulamentação.....	21
3.1.1.5	Outras aplicações.....	21
3.1.1.6	Estado da Arte.....	23
3.1.2	Ácido Lático.....	24
3.1.2.1	Estrutura química.....	24
3.1.1.2	Processo de obtenção.....	25
3.1.1.3	Regulamentação.....	25
3.2	REQUEIJÃO CREMOSO	26
3.2.1	Modelo de requeijão cremoso.....	26
3.2.1.1	Fonte proteica.....	30
3.2.1.2	Fonte de gordura.....	30
3.2.1.3	Sais emulsificantes.....	30
3.3	PROCESSAMENTO DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO	31
3.3.1	Coagulação ácida	31
3.3.2	Coagulação mista	32
3.3.3	Fusão da massa coagulada	33
3.4	PROPRIEDADES REOLÓGICAS E DE TEXTURA	33
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	35
3.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	37
3.7	CAPACIDADE QUELANTE.....	38

4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAL	40
4.2	MÉTODOS	40
4.2.1	Resumo esquemático dos métodos aplicados.....	40
4.2.2	Preparo das amostras.....	41
4.2.2.1	Preparo do LBA para quantificação de suas propriedades.....	41
4.2.3	Influência de tempo, temperatura e concentração de acidulante utilizado no processo de coagulação (ETAPA 2).....	44
4.2.4	Delineamento de experimentos para os modelos de requeijão cremoso.....	46
4.2.5	Análises realizadas.....	47
4.2.5.1	Adsorção	48
4.2.5.2	Solubilidade em água	48
4.2.5.3	Determinação de umidade e pH.....	48
4.2.5.4	Determinação de cinzas e cloretos.....	48
4.2.5.5	Acidez Titulável	49
4.2.5.6	Análise colorimétrica.....	49
4.2.5.7	Sinérese.....	50
4.2.5.8	Reologia.....	50
4.2.5.9	Medida instrumental de textura	51
4.2.5.10	Rendimento.....	51
4.2.5.11	Atividade de água (aw).....	51
4.2.6	Extração dos compostos dos modelos para análise subsequente.....	52
4.2.7	Atividade Antioxidante (FRAP).....	52
4.2.8	Atividade quelante.....	53
4.2.9	Potencial antimicrobiano.....	55
4.2.10	Análise estatística.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	ÁCIDO LACTOBIONICO	57
5.1.1	Adsorção e atividade de água	57
5.1.2	Solubilidade	58
5.1.3	Atividade antioxidante e quelante	59

5.1.4 Atividade Antimicrobiana.....	63
5.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DO PROCESSO DE COAGULAÇÃO	64
5.2.1 Umidade e pH	644
5.2.2 Aw.....	66
5.2.3 Medida instrumental de cor.....	68
5.2.4 Sinérese	71
5.2.5 Reologia	73
5.2.6 Capacidade quelante para amostras selecionadas	75
5.2.7 Capacidade antioxidante para amostras selecionadas	76
5.3 USO COMBINADO DE ÁCIDOS PARA A PRODUÇÃO DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	79
5.3.1 Umidade, pH, aw, cinzas e cloretos de modelos de requeijão cremoso	79
5.3.2 Acidez e medida instrumental de cor	82
5.3.3 Reologia.....	85
5.3.4 Textura.....	88
5.3.5 Capacidade antioxidante e quelante	91
5.3.6 Capacidade antimicrobiana.....	93
5.3.7 Sinérese e Rendimento	96
6 CONCLUSÃO.....	98
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
7 REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	130

1 INTRODUÇÃO

A partir da lactose, açúcar do leite, é possível obter compostos derivados, como o ácido lactobiônico (LBA), o qual vem sendo estudado para diversas aplicações. Sua produção e comercialização destinada para fins industriais e pesquisa, em 2016, foi de 15 mil toneladas/ano, não sendo encontrado dados mais recentes (CHEMICAL BOOK, 2016) e não apresentando atualmente produção no Brasil.

A aplicação do LBA na indústria de alimentos apresenta um futuro promissor devido às suas propriedades tecnológicas como quelante de íons metálicos, agente antimicrobiano, antioxidante, emulsificante, gelificante, acidulante, estabilizante e construtor de textura. Grande parte dos estudos mencionam suas propriedades, mas não as comprovam numericamente. A maior parcela dos estudos encontrados em literatura, tratam de métodos de obtenção do LBA e otimização desses processos, bem como aplicações para melhoramento de propriedades sensoriais de produtos (potencializador de sabor), enriquecimento de minerais e redução do tempo de processamento de queijo e requeijão. Atualmente, seu uso não é regulamentado na maior parte do mundo, no entanto, o Food and Drug Administration permite seu uso quando na forma de sal.

As propriedades do LBA estão em processo emergente de investigação, com o intuito de comprovar seu potencial de uso. A quantificação de suas propriedades como composto químico sólido ou em solução aquosa são escassas na literatura. O grande desafio é comprovar as propriedades do LBA mencionadas na literatura e que seu uso como aditivo em alimentos é capaz de trazer benefícios tecnológicos aos produtos aos quais serão incorporados, mesmo apresentando custos mais elevados.

Os processadores de alimentos têm buscado tecnologias inovadoras, tanto para produtos quanto para processos, visando aumentar a lucratividade dos negócios, mantendo a qualidade e a competitividade. A comprovação da viabilidade do uso do LBA na área alimentícia é o ponto de partida para o interesse de outros pesquisadores serem instigados e para o composto ser regulado em muitas partes do mundo em um futuro próximo. A inovação do presente estudo está relacionada à produção de um modelo de requeijão cremoso típico brasileiro produzido por um agente acidificante (LBA) pouco estudado na área de alimentos, em combinação com um agente acidificante tradicional (ácido láctico).

A utilização de uma matriz orgânica complexa permite a abertura de uma gama de interferências, as quais podem não estar relacionadas ao objetivo de estudo. A ideia principal do uso de modelos é diminuir as variáveis para que o entendimento do processo tenha como foco o composto principal, o LBA, aplicado em modelo de requeijão cremoso. Estudos teóricos divulgam seu potencial de uso na área de alimentos, como potencial antimicrobiano e antioxidante. O presente estudo busca a inovação por meio da comprovação dos dados bem como sua aplicação em produto alimentício.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar modelos de requeijão cremoso utilizando como agente acidificante o ácido lactobiônico isolado ou em combinação ao ácido láctico.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Quantificar a capacidade antimicrobiana do LBA em solução e nos modelos de requeijão cremoso frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*;
- Dimensionar a capacidade quelante do LBA em solução e nos modelos sobre os íons Fe^{2+} e Ca^{2+} ;
- Medir a capacidade antioxidante do LBA em solução por método indireto como o ABTS e DPPH;
- Averiguar as propriedades dos modelos obtidos e a sua proximidade com o requeijão cremoso comercial (umidade, pH, medida instrumental de cor, atividade de água, capacidade quelante de íon de ferro, capacidade antioxidante e antimicrobiano);
- Verificar a capacidade antioxidante, sinérese e propriedades reológicas dos modelos de requeijão acidificados com LBA e ácido láctico.

Motivação do trabalho

Os consumidores têm exigido alimentos mais naturais, preferencialmente ausentes de substâncias sintéticas conservadoras e aditivos, os quais muitas vezes são consideradas prejudiciais (CALO et al., 2015; GOUVEA et al., 2017; MORO et al., 2015). Desta forma, os aditivos não sintéticos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes podem ser uma alternativa desejável no processo produtivo de alimentos (SENAN et al., 2016). O LBA estudado seria uma dessas alternativas caso comprovado sua ação antioxidante e antimicrobiana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LACTOSE E SEUS DERIVADOS

A lactose (β -D-galactopiranosil-(1-4)-D-glucose) é um dissacarídeo presente no leite composto por dois monômeros, glicose e galactose (ZHAO et al., 2017). É produzida em grande escala por ser proveniente do soro obtido a partir da fabricação de queijos. A lactose encontra aplicação direta em alimentos. Além disso, esse açúcar também é precursor de substâncias derivadas de alto valor agregado, as quais são utilizadas principalmente em bebidas, panificados e confeitaria (BISINELLA et al., 2017; ZACCHERIA et al. 2017). A lactose pode ser convertida em outros produtos químicos por meio de processos como a fermentação microbiana especializada (TURNER et al., 2017), gerando compostos como os galacto-oligossacarídeos (GOS), lactitol, lactulose, lactosucrose, ácido láctico e LBA (BISINELLA et al., 2017; CHEN; ZHONG, 2017).

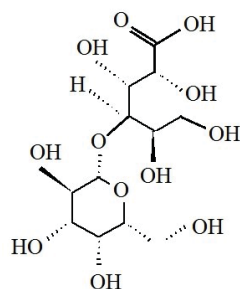
3.1.1 Ácido Lactobiônico

3.1.1.1 Aspectos químicos e funcionais

O LBA (ácido 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucônico) é um poli-hidroxiácido, que pode ser obtido por meio da oxidação de grupamentos aldeídos livres presentes na lactose. É composto de uma galactose e um ácido aldônico (ácido glucônico) os quais estão unidos por uma ligação éter (GUTIÉRREZ, 2012a). Esse composto por ser um ácido orgânico pode ser usado em processos alimentícios, como por exemplo na acidificação do meio para a produção de derivados lácteos, como os queijos, requeijões e seus modelos (RIBEIRO et al., 2016).

A molécula de LBA (FIGURA 1) apresenta peso molecular de $358,3 \text{ g.mol}^{-1}$, ponto de fusão entre $113\text{-}118^\circ\text{C}$, fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$ e pKa de 3,8 (25°C e 1 atm) (GUTIÉRREZ et al., 2012a). Sua aplicação é crescente em áreas como farmacológica (cremes dermatológicos), médica (conservante de órgãos para transplante), química (proteção contra corrosão de materiais ferrosos e aço) e alimentícia (produtos cárneos congelados e produtos lácteos).

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LBA



FONTE: HUANG et al., (2019).

3.1.1.2 Obtenção e comercialização

No ano de 1889, Fischer e Meyer realizaram a síntese do LBA pela primeira vez, utilizando o método de oxidação da lactose com o bromo. Na sequência, diversas técnicas para a sua obtenção foram estudadas (GUTIÉRREZ et al., 2012a), como os processos químicos, eletroquímicos (KOKOH; ALONSO-VANTE, 2006), biocatalíticos (BLOIS 1958; STODOLA; LOCKWOOD, 1947) e a hidrogenação catalítica (GLATTFELD; SCHIMPF, 1935).

A síntese por via biológica vem sendo estudada utilizando-se diferentes micro-organismos capazes de oxidar a lactose a LBA, como por exemplo, *Pseudomonas taetrolens* (ALONSO et al., 2015) e *Zymomonas mobilis* (MALVESSI et al., 2013). Como fonte natural de LBA, pode-se citar o Iogurte do Mar Cáspio o qual apresenta características semelhantes ao Kefir, sendo muito consumido no Japão (KIRYU et al., 2009).

A venda do LBA é realizada em solução ou em pó, tendo como principais produtores mundiais as empresas China Haohua Chemical Group Co., Ltd., Bio-Sugar Technology Co., Ltd., Novozymes, Sigma-Aldrich, Wuxi Sigma Chemical Product Co. Ltd. e Hubei Yuancheng Technology, Shanghai Hongbang Medical Technology CO., Ltd, Reliable Biopharmaceutical Corporation, Carbosynth Limited, Manus Aktteva BioPharma LLP e BOC Sciences. O mercado global é dividido nas regiões Ásia-Pacífico, Sudeste Asiático, América do Norte, Europa e o restante do mundo (DHANANJAY, 2017). A China é o maior exportador mundial do composto, porém, o mercado da Ásia-Pacífico tem apresentado uma taxa de crescimento elevada (MORDOR INTELLIGENCE, 2017). Segundo dados de Affertsholt (2007), o comércio de LBA gira em torno de 15 mil toneladas ao ano, com expectativa de crescimento anual de 5 % (a literatura não apresenta dados mais recentes para esse crescimento). Seu valor de compra

apresenta variação entre 2120 a 2510 dólares/kg dependendo do seu grau de pureza e marca (Alfa Aesar/ Sigma-Aldrich) (CHEMICAL BOOK, 2016).

3.1.1.3 Patentes

A produção de LBA teve início na década de 1950 e o melhoramento da sua obtenção pelo processo eletrolítico de oxidação foi patenteada por Magarieto e Islip, (1956). A partir de sua produção iniciaram-se pesquisas de aplicação em produtos alimentícios para o melhoramento de propriedades: sensoriais (realçador de sabor), físicas (redução da perda de umidade) e químicas (complexação de minerais). A patente US 6916496 depositada pela Kraft Foods (KOKA et al., 2005) apresentava como proposta o uso do LBA como acidulante direto em uma ampla variedade de queijos. Os autores afirmam que são formados produtos de características sensoriais aceitáveis, com redução no tempo de processamento, aumento do rendimento de produção e possível redução de custo.

Outra aplicabilidade depositada em patente foi o uso do LBA em produtos cárneos (NIELSEN, 2005). Os inventores descobriram que a sua presença reduz a perda de água após congelamento/descongelamento e cozimento, quando comparado com um produto à base de carne ausente de LBA. A aplicação do LBA sugerida por Nielsen (2006) buscava compensar a deficiência de cálcio de parte da população que não tolerava o consumo de leite. Tratava-se de produtos não lácteos (sucos de frutas, cafês, cerveja), de sabor agradável, enriquecidos de cálcio por meio do uso de lactobionato de cálcio (sal obtido por meio da oxidação da lactose).

Patente aplicada a produtos fermentados fez uso do LBA de modo a estabelecer uma metodologia para o preparo de um produto de melhores propriedades sensoriais, principalmente em relação ao sabor azedo (LYNGLEV et al., 2007). Os autores descrevem a conversão de lactose em LBA pelo uso de uma enzima oxidase e estabelecem que o processo fermentativo reduz o pH, formando um líquido homogêneo e viscoso. A utilização de complexos minerais de LBA foi descrita em patente depositada por Baldwin et al., (2010b). Os autores relatam que o complexo mineral se mostrou um eficiente fortificante para produtos alimentares e bebidas, com os benefícios de não afetar significativamente as propriedades sensoriais e ser produzido de forma econômica (lactose ou soro de leite).

Nielsen e Hoeier (2009) sugeriram um método de fabricação de queijos onde o LBA (ou o seu sal) seria introduzido na coalhada por meio de injeção, utilizando agulha ou corrente de jato. As vantagens desta técnica incluem a perda reduzida do LBA, além da possibilidade de se calcular a quantidade introduzida e absorvida pelo produto. Walter; Belgli, (2011), por sua vez, patentearam um sistema potencializador de sabor utilizando o LBA, lactobiono- δ -lactona, sal de LBA ou uma mistura destes, para aplicação em alimentos, visando intensificar os sabores ácido, frutado, doce e salgado. Na TABELA 1 estão resumidos alguns dos principais dados de patentes encontradas na literatura relacionando a produção e aplicação do ácido lactobiônico em alimentos.

TABELA 1 – PATENTES RELACIONADAS AO LBA

Patentes depositadas	Referência
Melhoramento da sua obtenção pelo processo eletrolítico de oxidação.	MAGARIETO; ISLIP, (1956)
Acidulante direto em uma ampla variedade de queijos (produtos de características sensoriais aceitáveis, com redução no tempo de processamento, aumento do rendimento de produção e possível redução de custo).	KOKA et al., (2005)
Utilização em produtos cárneos para redução da perda de água após congelamento/descongelamento e cozimento.	NIELSEN, (2005)
Produtos não lácteos (sucos de frutas, cafés, cerveja) enriquecidos de cálcio por meio do uso de lactobionato de cálcio (sal obtido por meio da oxidação da lactose).	NIELSEN, (2006)
Uso em produtos fermentados para formar produtos de melhores propriedades sensoriais (em relação ao sabor azedo).	LYNGLEV et al., (2007)
Uso de complexos minerais de fortificação utilizando-se do LBA, para aplicação em produtos alimentares e bebidas.	BALDWIN et al., (2007)
Método de fabricação de queijos por injeção na coalhada do ácido lactobiônico ou o seu sal (perda reduzida do LBA).	NIELSEN; HOIER, (2009)
Sistema potencializador de sabor (ácido, frutado, doce, umami e salgado).	WALTER; BELGI, (2011)

FONTE: A autora (2019).

3.1.1.4 Regulamentação

Um estudo realizado na Bélgica em 1994 por Dokkum e seus colaboradores mostrou que o consumo diário entre 12 e 24 g do ácido lactobiônico por homens na faixa de 23 anos causou flatulência devido à fermentação no cólon, sendo esta quantidade tolerável ao organismo. Entretanto, há de se considerar a quantidade elevada desta ingestão e a escassez de estudos relacionados ao LBA em alimentos. Boa parte desta falta de informação advém da ausência de regulamentação do ácido como aditivo alimentar em grande parte do mundo, dificultando estudos sensoriais. Segundo comunicado via e-mail da ANVISA (protocolo número 2017862367), não há registro do ácido lactobiônico na base de dados da Gerência Geral de Alimentos (GGALI), bem como o mesmo não passou por avaliação de segurança (Anexo A).

De acordo com o FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017) e estudos toxicológicos, o uso de LBA como aditivo na forma de sal em alimentos é seguro (AHMAD et al., 2004). A Agência Europeia de Segurança Alimentar, porém, ainda faz questionamentos quanto ao seu efeito a longo prazo sobre a saúde humana (GUTIÉRREZ et al., 2012a; PLEISSNER et al., 2017).

3.1.1.5 Outras aplicações

As propriedades do LBA vêm sendo estudadas principalmente a partir de sua aplicação em produtos fármacos e cosméticos. Na TABELA 2 estão dispostas de forma resumida as propriedades referentes ao LBA mencionadas na literatura por diferentes autores.

TABELA 2 – PROPRIEDADES DO LBA

Propriedades do LBA	Referência
Acidulante	BISINELLA et al., (2017)
Antimicrobiano	CHEN; ZHONG, (2017); CAO et al., (2019)
Antioxidante	SAARELA et al., (2003); GODERSKA, (2019a)
Biodegradável	STODOLA; LOCKWOOD, (1947); BEZERRA et al., (2017); PLEISSNER et al., (2017)
Construtor de textura	AHMAD et al., (2004)
Emulsificante	GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, (2012b); PLEISSNER et al., (2017)
Enriquecimento de Cálcio	BALDWIN, et al., (2010); PLEISSNER et al., (2017)
Estabilizante/Gelificante	SAARELA et al., (2003); GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, (2012b)
Prebiótico	GODERSKA, (2019a)
Quelante de íons divalente	ISAACSON et al., (1989); PLEISSNER et al., (2017)
Umectante	ALGIERT-ZIELIŃSKA; MUCHA; ROTSZTEJN, (2019)

FONTE: A autora (2019).

Na área médica, o LBA é utilizado como um ligante específico e desta forma pode atuar durante transporte de drogas utilizadas no tratamento de câncer de fígado e de mama (ALGIERT-ZIELIŃSKA et al., 2019; WANG et al., 2018). No desenvolvimento de novos produtos biofarmacêuticos, o LBA encontra uso pela sua alta atividade antioxidante, fator importante no tratamento da osteoporose, no impedimento da oxidação de substâncias e prevenção de doenças vasculares (GODERSKA, 2019; RUSCIANO et al., 2018). Além disso, devido à sua alta capacidade de se ligar a água e formar géis, o ácido lactobiônico é utilizado na área de cosmetologia para a hidratação de pele (ALGIERT-ZIELIŃSKA et al., 2019; TASIĆ-KOSTOV et al., 2019). Na área química, o LBA é utilizado como proteção contra corrosão de materiais ferrosos e aço, não apresentando toxicidade quando comparado com outros produtos anticorrosivos (RAO et al., 2014). Para uso doméstico, é adicionado em detergentes de louças e sabão em pó, uma vez que apresenta boas propriedades emulsionantes e alta solubilidade em água (GERLIN; WILKE 1991).

3.1.1.6 Estado da arte

O método de acidificação direta vem sendo estudado a muitos anos, sendo possível encontrar na literatura diversos estudos aplicando ácidos orgânicos na produção de derivados lácteos como queijos (ACIDULANTES, 2017). A utilização do ácido láctico com esse propósito é conhecida e muito aplicada na área (KRISHNA et al., 2019; MACHADO et al., 2011; NAZÁRIO, 1951). Por outro lado, pouco se conhece sobre o processo de acidificação direta utilizando o ácido orgânico LBA.

Até o presente momento as informações referentes ao LBA ainda são escassas na área de alimentos. A inserção desse composto na área de alimentos é recente e vem sendo aos poucos estudada. As lacunas que surgem estão relacionadas à comprovação de seus benefícios e quais dosagens são necessárias para que essa ação benéfica seja aparente, sem que ocorra alteração nas características originais do produto. Vale ressaltar que a sua ação pode ser diferente dependendo da matriz alimentícia aplicada, sendo necessário dessa forma, estudos específicos para cada alimento. Na TABELA 4 estão listados alguns estudos recentes encontrados, utilizando o LBA na área de alimentos.

TABELA 3 – ESTUDOS RECENTES DA APLICAÇÃO DO LBA EM ALIMENTOS

Título	Referência
Lactobionic Acid: Significance and Application in Food and Pharmaceutical	BALAKRISHNAN et al., (2017)
A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and <i>Lactobacillus casei</i>	GARCÍA et al., (2019)
Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A in tryptic soy broth and milk	CHEN; ZHONG, (2017)
The antioxidant and prebiotic properties of lactobionic acid	GODERSKA, (2019)

FONTE: A autora (2021).

Estudo recente sobre o tema foi realizado por Ribeiro et al., (2016), dando início à descoberta de sua aplicação como composto acidificante em modelos lácteos. Ribeiro et al., (2016) utilizou o LBA no processo de acidificação de géis lácteos em substituição a glucono- δ -lactona apresentando diferenças na estrutura proteica em pH 6,2, o que levou a alterações nas propriedades mecânicas, estabilidade térmica e de solubilidade. O ponto

de maior relevância no estudo de Ribeiro et al. (2016) foi a estabilidade que o LBA proporcionou aos géis lácteos em relação à perda de água, pois a sinérese excessiva é considerada um problema tratando-se de géis com glucono- δ -lactona. O presente estudo dá sequência ao estudo proposto por Ribeiro et al. (2016), entrando em pontos sugeridos como aplicação em um tipo diferente de modelo de queijo e principalmente estudo sobre a capacidade quelante do ácido lactobiônico.

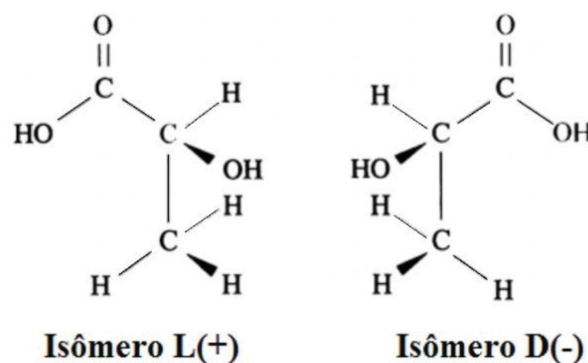
Ao fim desta revisão bibliográfica, verifica-se a necessidade de estudos devido as lacunas referentes às suas propriedades e características do LBA ao ser aplicado na produção de alimentos. Devido ao fato de grande parte da população buscar produtos de maior qualidade nutricional e baixa incorporação de agente conservadores, o estudo de compostos alternativos, bem como de suas propriedades é de suma importância. Esse estudo proporcionará um melhor entendimento da ação do LBA e permitirá o desenvolvimento de nova aplicação na área de alimentos.

3.1.2 Ácido Lático

3.1.2.1 Estrutura química

O ácido láctico (ácido 2-hidróxipropanóico) é o principal produto da fermentação láctica apresentando efeitos antimicrobianos em alimentos de origem animal e vegetal (CARPENTER et al., 2011; WANG et al., 2013). Trata-se de um ácido monocarboxílico encontrado tanto na forma D(-) quanto na forma L(+), devido à quiralidade do seu carbono assimétrico, como pode ser observado na FIGURA 2 (ANGERMAYR et al., 2016). Apresenta peso molecular de 90,08 g.mol⁻¹, ponto de fusão entre 16,4-18,0 °C, fórmula molecular C₃H₆O₃ e pKa de 3,86 (25 °C e 1 atm) (CIABOTTI et al., 2009; DUSSELIÉ et al., 2013).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO LÁTICO



FONTE: KASHI et al., (2018).

3.1.2.2 Processo de obtenção

A maior parte do ácido láctico produzido mundialmente (90 %) é obtida por fermentação bacteriana, utilizando-se micro-organismos do gênero *Lactobacillus* (ABDEL-RAHMAN et al., 2013). A síntese via processo químico resulta sempre em uma mistura racêmica (DL-ácido láctico) (PIZATO; SARAIVA, 2015).

Na década de 60 o ácido láctico era produzido por método químico utilizando compostos de origem petrolífera (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; WEE, et al., 2006). Porém, no decorrer dos anos a sua produção via biotecnológica foi ganhando espaço (WEE, et al., 2006). Na década de 90, o volume anual da produção mundial de ácido láctico era de 40 mil toneladas e o preço variava entre US\$ 1,38/kg e US\$ 1,54/kg, dependendo do seu grau de pureza (WEE, et al. 2006). Em 2007 a produção foi de aproximadamente 150 mil toneladas, e em 2010, a joint venture Cargill Dow anunciou uma produção de ácido láctico de 500 mil toneladas. Nos últimos anos têm-se verificado um aumento na procura de ácido láctico, com aumento de produção anual entre 5 e 8 % (RODRIGUES et al., 2016). Em 2019, o preço médio variou entre US\$ 3-4/kg (DE OLIVEIRA et al., 2018). De acordo com o mesmo autor é estimado que em 2025 a produção requerida seja de aproximadamente 1,96 milhões de toneladas.

3.1.2.3 Regulamentação

De acordo com a Portaria nº 359, de 1997 do Ministério da Agricultura, e Pecuária e Abastecimento é permitido o uso de ácido láctico como aditivo alimentar para regulação de acidez em requeijão (tipo de queijo cremoso) (BRASIL, 1996). O ácido láctico apresenta registro na ANVISA (nº 80146501641), como composto acidulante, com última

atualização em 2021 (ANVISA, 2021). Está legalmente autorizado pela U.S. (Food and Drug Administration Food and Drug Administration, 2017), como agente antimicrobiano, conservador e regulador de acidez.

3.2 REQUEIJÃO CREMOSO

O requeijão cremoso é um queijo cremoso típico brasileiro. De acordo com o Ministério da Agricultura, e Pecuária e Abastecimento:

Requeijão ou Requesón (agora apenas chamado de Requeijão) é o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. O produto poderá estar adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias. A denominação Requeijão está reservado ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea (BRASIL, 1997).

3.2.1 Modelo de requeijão cremoso

Os requeijões tradicionais apresentam diversas variáveis de processo que os tornam matrizes complexas para pesquisas científicas. A composição do leite, tipo de coagulante (enzimas, bactérias lácticas ou acidificação direta), temperatura de coagulação e pH são fatores que influenciam diretamente no produto final (MORIN-SARDIN et al., 2016). Os modelos de requeijão ou géis lácteos têm como finalidade na pesquisa reduzir as variáveis interferentes nas respostas que se deseja obter (RIBEIRO et al., 2016).

A diferença do modelo de requeijão para o produto natural baseia-se no fato de que o mesmo não é produzido diretamente de leite e sim de um conjunto de ingredientes como proteínas, gorduras, estabilizantes e minerais (KAPOOR, ROHIT; METZGER, 2008; LEE et al., 2003). Sua formação ocorre por aplicação de calor (JURADO; RUIZ-NAVARRO, 2018), acidificação (RIBEIRO et al., 2016), coagulação e opcionalmente incorporação outros ingredientes.

Os modelos apresentam semelhanças ao requeijão tradicional em relação a sua composição e aparência. Os diferentes tipos de modelos de requeijão (classificados em derivados do leite, parcialmente derivados do leite ou não derivados do leite) (BADEM; UÇAR, 2016) podem ser produzidos por uma variada fonte de gordura (manteiga, gordura anidra do leite ou óleos vegetais), proteínas (caseínas e seus derivados), ácidos, aromas,

água e outros ingredientes, podendo ser coagulados pelas vias ácida ou enzimática e estabilizados por sais emulsificantes (MASOTTI et al., 2018), resultando em uma mistura homogênea por ação mecânica (GUINEE et al., 2004).

Os modelos comerciais de requeijão cremoso produzidos com gorduras não lácteas apresentam composições variadas e características de qualidade muito diferentes do produto original tornando o produto pouco aceito pelos consumidores (RESCHKE, 2007). Um grande apelo ao consumo desses produtos está relacionado a questões nutricionais, visto que a preocupação da população com uma dieta balanceada aumentou consideravelmente nos últimos anos (SELEET et al., 2014; SOŁOWIEJ; NASTAJ, 2016). Como benefícios pode-se citar simplicidade de fabricação, capacidade de atender necessidades dietéticas específicas e benefícios à saúde (baixo nível de calorias, ser livre de lactose, baixa concentração de gorduras saturadas, enriquecimento com vitaminas e estabilidade de textura) (GUINEE, 2016). O grande desafio do processamento consiste em desenvolver um produto de forma a combinar ingredientes e garantir propriedades funcionais, reológicas e sensoriais semelhantes ou superiores ao requeijão tradicional (RIBEIRO et al., 2016).

A tecnologia aplicada a modelos permite que a produção seja planejada para atender as necessidades do mercado, além de facilitar o processo da pesquisa devido a uma maior uniformidade entre lotes (qualidade constante devido a condições controladas), maior durabilidade em sistema de armazenamento, sem apresentar variações sazonais quando comparado com o requeijão tradicional (RIBEIRO et al., 2016). Sua textura pode ser manipulada por meio de alterações da formulação (água e gordura) e condições de processamento.

A legislação brasileira ainda não regulamenta a produção e venda de modelos de requeijão, o que pode ser um problema, visto que não são estabelecidas regras quanto a limites para a adição de ingredientes, bem como não há padrões físico-químicos e microbiológicos específicos de qualidade (MASOTTI et al., 2018). É de grande importância ao consumidor indicação clara e legível na embalagem dos produtos uma indicação de que se trata de um produto modelo ao requeijão tradicional.

Os produtos modelos encontram um vasto campo de aplicação na fabricação de queijo e requeijão destinados ao uso como ingredientes, porém, há necessidade de estudos para melhorar o entendimento da tecnologia de produção, visto que a sua obtenção deve ser vantajosa e o produto final deve apresentar qualidade físico-química, nutricional e

sensorial aceitável (RIBEIRO et al., 2016). As características dos modelos lácteos e sua reprodutividade estimulam a intensificação desta técnica de estudo de modo a minimizar as variáveis interferentes para a obtenção de resultados de maior confiabilidade. A TABELA 3 a seguir resume alguns dos estudos encontrados atualmente sobre modelos de queijo e requeijão.

TABELA 4 – ESTUDOS RECENTES APLICADOS A MODELOS DE QUEIJO E REQUEIJÃO

Título	Objetivo	Principais resultados	Referência
Comunicação curta: Avaliação de culturas comerciais de carne para inibir <i>Listeria monocytogenes</i> em um modelo de laboratório de queijo fresco	Avaliar se culturas protetoras de <i>L. monocytogenes</i> em carnes podem ser aplicados para controlar patógeno em queijo fresco.	As culturas bacterianas não inibiram significativamente o crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em queijo fresco. Os resultados deste estudo destacam a complexidade das interações bacterianas e a variação entre alimentos matrizes.	LAWTON et al., (2020)
A disposição dos consumidores para comprar imitações de produtos lácteos (análogos) com base na modelagem de equações estruturais	Examinar a reputação das imitações de creme azedo, e a opinião dos consumidores sobre os fatores que podem afetar a compra de produtos imitações.	A maioria dos consumidores já comprou um produto 69,65 % deles compraram acidentalmente. A disposição de compra está relacionada ao custo-benefício, habilidade culinária do entrevistado, conhecimento e preferência geral do produto.	IZSÓ et al., (2019)
O uso de inulina, maltitol e lecitina como substitutos de gordura e plastificantes em um modelo de produto semelhante a queijo mussarela reduzido em gordura	Avaliação dos efeitos da redução de gordura nas propriedades físico-químicas de queijo mussarela produzido utilizando compostos de substituição	A inulina e a lecitina diminuíram a interação hidrofóbica do queijo com baixo teor de gordura. O maltitol melhorou a elasticidade do queijo, aumentou a interação hidrofóbica na matriz da caseína e apresentou uma temperatura de transição vítrea mais baixa (Tg) do que os outros queijos.	LI et al., (2019)
Características do queijo análogo do extrato de milho adicionado de papaína e extrato de abacaxi	Descobrir a fórmula ideal para adicionar papaína e extrato de abacaxi para produzir queijo análogo substituído por milho.	Fórmula ideal: Adição de 40 mL de extrato de abacaxi e 130,82 mg de extrato de papaína.	AINI et al., (2019)

FONTE: A autora (2019).

3.2.1.1 Fonte proteica

A proteína em requeijão e seus modelos tem como função a estabilização da emulsão óleo-água pela redução da tensão na interface desses compostos e pelo aumento da viscosidade da fase aquosa (FU et al., 2018). O termo “concentrado de proteína de leite” (CPL) é aplicado quando o produto contém 50-85 % de proteína e apresenta importância como fonte proteica alternativa na fabricação de modelos de queijo (NOVAK, 1992).

O concentrado de proteína de leite é produzido a partir do leite desnatado ou parcialmente desnatado, por tratamento térmico adequado (HTST, UHT) com remoção parcial da lactose e minerais pelo processo de separação por membrana e remoção de água por evaporação (BORGES et al., 2001). O concentrado contém caseína e proteínas do soro nas proporções originais do leite, com altos níveis de cálcio micelar. O teor de proteína pode ser selecionado entre 50 e 90 % por extrato seco (NOVAK, 1992).

3.2.1.2 Fonte de gordura

O desenvolvimento de modelos de requeijão necessita a incorporação de fontes de gordura de origem animal ou de origem vegetal como alternativas mais baratas. A gordura é fundamental no aspecto sensorial dos alimentos por contribuir diretamente com o sabor, cremosidade, aparência, odor, textura e suculência. Suas propriedades físico-químicas como o grau de insaturação, a distribuição de ácidos graxos e sua configuração molecular afetam as propriedades físicas dos alimentos (viscosidade, espalhabilidade e cristalinidade) (RAMEL; MARANGONI, 2017).

Na estrutura da matriz do queijo e seus modelos, os glóbulos de gordura estão aprisionados fisicamente em uma rede de proteína com ligações cruzadas de fosfato de cálcio (MICHALSKI et al., 2007). O desenvolvimento da textura no queijo ocorre devido à quebra da α_{s1} -caseína durante a maturação e, ao remover parte da gordura, a proteína passa a desempenhar uma função maior na textura do queijo (LAMICHHANE et al., 2017).

3.2.1.3 Sais emulsificantes

Os sais emulsificantes são empregados com o objetivo de sequestrar o cálcio e regular o pH (GUPTA et al., 1984). Apresentam função de hidratação das caseínas (deslocam os complexos de fosfato de cálcio na rede de fosfato de cálcio-paracaseinato insolúvel) de forma a interagir mais facilmente com as fases de água e gordura,

produzindo uma emulsão homogênea (GUPTA; KARAHADIAN; LINDSAY, 1984; CARIC; KALÁB, 1997; GUINEE; CARIČ; KALÁB, 2004; KAPOOR; METZGER, 2008). O tipo e a concentração do sal emulsificante influenciam fortemente as características do produto final.

3.3 PROCESSAMENTO DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO

Para que ocorra a formação do modelo de requeijão é importante que as proteínas (caseínas) coagulem de forma a aprisionar a gordura e formar um gel (massa base) (KOUTINA et al., 2016). Isso pode ocorrer por acidificação a pH 4,6 (coagulação máxima por se tratar do ponto isoelétrico), com produção de ácido láctico pelas bactérias do fermento, por adição de enzimas (coalhos) ou por adição de ácidos orgânicos (ABEYKOON et al., 2016). A caseína é constituída de aminoácidos essenciais e considerável quantidade de minerais (cálcio e fósforo) que participam do processo de coagulação do leite, influenciando a textura da massa base do requeijão e seus modelos (PERREAULT et al., 2017). Cada queijo é formado a partir de uma coagulação específica e intrínseca, a qual é responsável pelas características finais do produto.

3.3.1 Coagulação ácida

Quando o pH é o natural do leite (6,80) as caseínas apresentam repulsão eletrostática devido a um excesso de carga negativa (BRASIL et al., 2015). Para que ocorra a coagulação, as bactérias iniciadoras devem reduzir a lactose e a base proteica deve ser solubilizada (KONGO; MALCATA, 2016).

O interior da caseína é constituído por $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -CN e nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal (FCC), que é constituído por cálcio, magnésio, fosfato e citrato. Ao redor tem-se a beta caseína (menor quantidade e menos fosfatos). Na parte mais externa tem-se a kappa caseína (em quantidade ainda menor) responsável pela estabilização estérica formando uma barreira contra a associação com outras micelas.

Grande parte da k-caseína possui caráter hidrofílico, facilitando a interação com a água devido a uma quantidade apropriada de aminoácidos hidrofílicos (HICKEY et al., 2015). A estabilidade da micela é reduzida quando aproximadamente 85% do total de κ -caseína for hidrolisada. As cargas elétricas se anulam até atingir o ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6), onde as moléculas se unem (associação hidrofóbica de agregados micelares) formando um complexo denso tridimensional e precipitam (EVERETT; AUTY, 2008; HICKEY et al., 2015). Ou seja, ao colidirem entre si, elas permanecem em

contato formando uma nova rede. O processo fermentativo tem duração variável dependendo da firmeza do coágulo que se deseja obter (GUIMARÃES et al., 2017; PEREIRA, et al., 2016). Fatores como a concentração de proteínas, agentes de acidificação, temperatura e pH final da fermentação interferem diretamente nas características do coágulo formado.

Quando se faz a acidificação direta, ocorre a incorporação do ácido que seria produzido pelas bactérias durante o processamento pelo método tradicional dos queijos convencionais (OLIVEIRA et al., 2014). Com a diminuição do pH, as propriedades da micela de caseína são alteradas, de modo a dissociar o fosfato de cálcio coloidal e atingir a neutralização das cargas negativas das micelas.

Neste caso, o tempo de fabricação é reduzido, pois o pH é atingido mais rapidamente. A acidificação direta a quente resulta em precipitação rápida de caseína (devido ao aumento do movimento térmico e colisões) com gelificação em valores de pH mais elevados (TORRES et al., 2017). Como vantagem desta técnica, pode ser citado um maior rendimento de produção e de retenção de água das massas base de requeijão (queijos convencionais) (OLIVEIRA et al., 2016).

3.3.2 Coagulação mista

A coagulação mista consiste em utilizar enzimas coagulantes e ácido láctico (produzido por culturas lácticas ou incorporado diretamente) de maneira conjunta. O coágulo formado a partir das duas técnicas apresentam diferenças entre si e quando combinados forma um produto com características mescladas (LOURENÇO NETO, 1994). Acidificação entre pH 5,8 e 6,2 reduz a repulsão da carga e aumenta a solubilização do cálcio acelerando o tempo de coagulação devido a uma maior quantidade de κ -caseína disponível (HICKEY et al., 2015). A temperatura de coagulação deve ser superior a 18 °C (abaixo disso não ocorre a formação de gel) e inferior a 55-60 °C (PAULA et al., 2009). Os géis formados a partir de coagulação com enzima são mais abertos, porosos, permeáveis, isso porque a formação de rede de caseína é significativamente menor devido ao pH e como consequência de uma rede mais aberta, apresentam uma maior capacidade de sofrer sinérese quando comparados aos géis formados por acidificação direta (LUCEY; MADISON, 2011).

3.3.3 Fusão da massa coagulada

A fusão ocorre por meio do aquecimento e agitação da massa para completa homogeneização, utilizando uma temperatura entre 70 – 95 °C por 4 - 15 minutos (indústria - 80 °C durante 15 segundos) (BRASIL, 1997). As características finais do produto dependem do tempo/temperatura da fusão, da formulação, acidez, equilíbrio salino entre o cálcio e o caseinato e intensidade da agitação (ALVES et al., 2007; VAN DENDER, 2001). O calor influencia a peptização da caseína e a estrutura do produto final.

O objetivo consiste em fundir a proteína e a gordura do queijo, por ação de calor (é indicado o uso de temperaturas superiores a 75 °C, para garantir a pasteurização do produto) e agitação mecânica. O tratamento mecânico da massa permite que os ingredientes sejam misturados de forma adequada de modo a garantir uma emulsão estável e homogênea (MEYER, 1973). Nesta etapa é necessário a adição de sais fundentes para evitar a separação de gordura e de água (OLIVEIRA, 1986). A estrutura da massa base de queijo é modificada devido principalmente a afinidade dos sais fundentes com o cálcio onde os íons são removidos da micela da caseína permitindo a entrada de íons de sódio que ao fazer ligação com o caseinato, torna-o mais solúvel (VAN DENDER, 2006).

3.4 PROPRIEDADES REOLÓGICAS E DE TEXTURA

A estrutura do alimento é um parâmetro perceptível aos consumidores durante a alimentação. A sua formação é proveniente do processamento dos alimentos, desde a desintegração dos ingredientes, desestabilização da estrutura original, alterações bioquímicas até o dimensionamento de uma nova estrutura (RENZETTI; JURGENS, 2016). A reologia se refere às características de escoamento e deformação desta nova estrutura quando submetidos a uma dada tensão (PATEL et al., 2017). As propriedades estruturais, de superfície e mecânicas dos alimentos (textura) estão correlacionadas à percepção sensorial, sendo ambas de grande importância no controle de qualidade dos alimentos.

Reologicamente, os modelos de requeijão cremosos são classificados como pseudoplásticos, onde a relação tensão-deformação apresenta simultaneamente características de líquidos e sólidos (FOX et al., 2017a). A medida da reologia envolve a deformação de uma amostra por meio de aplicação de força ou tensão (τ) em algum sentido (compressão, cisalhamento, extensão ou pressão). O deslocamento em resposta à

força no ponto de aplicação é conhecido como deformação (γ) (mudança de forma temporária, permanente ou parcialmente recuperável) (GUINEE, 2015). A tensão (τ) corresponde a uma força (F) aplicada por unidade de área (A) enquanto que a variação da deformação em função do tempo corresponde à taxa de deformação ($\dot{\gamma}$).

As propriedades reológicas e as respostas obtidas são afetadas pelas condições de análise como temperatura, tipo de tensão aplicada e taxa de deformação, além da composição da amostra como teor de gordura, proteínas, umidade, pH e características de processamento, como a maturação (O'CALLAGHAN; GUINEE, 2004). De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT a textura pode ser definida como todas as propriedades reológicas e estruturais de um alimento, perceptíveis pelos receptores mecânicos, táteis e de maneira eventual por receptores visuais e auditivos (ABNT, 1993). Os parâmetros da estrutura do gel do requeijão e dos seus modelos podem ser medidos por métodos analíticos, como reologia oscilatória em altas ou baixas amplitudes, reologia rotacional e testes de penetração os quais não apresentam correlação proporcional e por isso não podem ser comparados entre si (MOKOONLALL et al., 2016).

Os queijos são considerados materiais viscoelásticos, pois na parte elástica a energia mecânica fornecida é armazenada e na parte viscosa a energia é dissipada (LUCEY et al., 2003). O comportamento reológico está relacionado diretamente com as condições de fabricação e composição (proteína, gordura, minerais e água) (FOX et al., 2000). Desta forma, o comportamento reológico é dependente da variedade do queijo, desde um comportamento viscoso para o requeijão cremoso e comportamento elástico para queijos duros (O'CALLAGHAN; GUINEE, 2004).

O comportamento reológico e térmico da matriz alimentar é de grande importância quando se deseja compreender suas propriedades de modo a projetar alimentos que atendam às demandas de saúde, atratividade sensorial e conveniência (RENZETTI; JURGENS, 2016). Para a indústria, a substituição de métodos sensoriais por dados instrumentais, diminui consideravelmente o tempo e o custo de detecção de dados (TAPPI et al., 2017).

A espalhabilidade do requeijão cremoso em temperatura ambiente ocorre devido à agitação e homogeneização da massa que resultam em uma matriz proteica pouco rígida (RUIZ et al., 2009). As características de textura normalmente avaliadas em requeijão cremoso são: firmeza, elasticidade, coesividade, adesividade e espalhabilidade (CAMPOS, 1989; VERMA; GUPTA, 1981; SHIMP, 1985), sendo a textura em muitos

casos tão importante quanto aroma e sabor para o produto final (SHOEMAKER; NANTZ; BONNANS; NOBLE, 1992). A umidade e a gordura são os constituintes que mais influenciam na firmeza do produto final. Ao aumentar a umidade, a firmeza é reduzida consideravelmente (OLSON; PRICE, 1961). Ao reduzir o teor de gordura, as proporções de proteína e umidade aumentam. Em reduções consideráveis de gordura podem ocorrer defeitos na textura, como maior firmeza e adesividade (SIPAHIOGLU et al., 1999).

A análise de perfil de textura (TPA) é um conjunto de medidas realizadas por um instrumento com base na imitação da compressão realizada pela mordida em um alimento (LI et al., 1998). Os instrumentos são usados devido à precisão e exatidão dos dados obtidos. O probe entra em contato com a amostra e registra em forma de gráfico a resistência. A partir dos dados é possível calcular diversos parâmetros de interesse na amostra. Dentre os parâmetros que podem ser obtidos pelo gráfico pode-se citar: firmeza (força máxima na primeira compressão), adesividade (energia requerida para remover o material aderido durante a mastigação), coesividade (extensão máxima do material antes de romper), elasticidade (velocidade que o material deformado volta ao estado inicial após remoção da força aplicada) e gomosidade (energia suficiente para a desintegração do produto semissólido) (FOEGEDING; DRAKE, 2007; SZCZESNIAK, 2002).

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são moléculas instáveis e formados de maneira natural pelo metabolismo, sendo gerados no organismo por reações de óxido-redução (TOPAL et al., 2016; WANG et al., 2017). A formação desses radicais é determinada por fatores ambientais e biológicos (exposição à luz ultravioleta, poluição e produtos químicos) e pode trazer riscos para a saúde quando produzido de maneira demasiada (MACHLIN; BENDICH, 1987; SHEBIS et al., 2013). Houve um aumento progressivo de estudos nos últimos anos relacionados a esses compostos, devido à possibilidade do seu consumo via alimentação, à minimização da ação dos radicais livres e, conseqüentemente, à redução dos riscos de doenças (KIM et al., 2019; OGUNLADE et al., 2019; PARSONS, 2017; QURESHI et al., 2019; TERESITA et al., 2019).

Os compostos chamados de antioxidantes são molécula que atuam por meio da neutralização de radicais livres de novo a prevenir os danos causados por eles (HOYOS-ARBELÁEZ et al., 2017). Para que apresentem atividade, é necessário estarem presentes em quantidades suficientes, devem ser efetivos em concentração baixa e durante todo o

período de armazenamento do produto (CHOE; MIN, 2009). O objetivo dos antioxidantes é tornar os radicais livres indisponíveis de modo a não produzir espécies oxidantes (ALMEIDA et al., 2016).

A avaliação da capacidade antioxidante pode ser determinada utilizando-se métodos instrumentais, colorimétricos, eletroquímicos e biológicos (SOUZA et al., 2012). A medida da redução de um radical livre pode ser realizada por métodos indiretos, como ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) e o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (HOYOS-ARBELÁEZ et al., 2017; PARSONS, 2017). A falta de padronização entre os métodos, variações na composição de antioxidantes de uma matriz alimentar e muitas vezes ensaios de uma mesma mistura de antioxidantes, são capazes de fornecer respostas diferentes em cada método, dificultando a comparação de dados publicados (PARSONS, 2017).

O método do DPPH é um dos métodos mais antigos utilizados para se determinar a atividade antioxidante de alimentos, sugerido pela primeira vez na década de 1950 (BLOIS, 1958). Comercialmente o radical livre DPPH● (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) apresenta cor púrpura (leitura em 517 nm) e solubilidade em metanol (AKAR et al., 2017; PEKAL; PYRZYNSKA, 2015). Quando misturado em um antioxidante, o radical livre é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela com menor leitura de absorbância (PEKAL; PYRZYNSKA, 2015). O método do radical DPPH● é um método rápido pertencente ao grupo que apresenta capacidade de doar hidrogênio e pode ser aplicado para antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis, para compostos puros ou amostras de alimentos (AKAR et al., 2017). A porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (RIGOTTI et al., 2016). Por outro lado, a concentração inibitória (CI 50) corresponde à quantidade necessária de antioxidante para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 % (DOS SANTOS et al., 2017).

O radical ABTS (2,2'-Azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) é um radical livre estável e colorido, o qual deve ser gerado por reações enzimáticas/químicas (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). É solúvel em meio aquoso e em meio alcoólico sendo usado na determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (ISLAM et al., 2019). O ensaio tem como base a redução do ABTS+ (cor azul esverdeado escuro) a ABTS (cor azul esverdeado claro), no meio reacional (FARDET; ROCK, 2017). Normalmente, esta redução é medida após um tempo de incubação de 30 min utilizando um espectrofotômetro em comprimento de onda de

734 nm (SHIVAKUMAR; YOGENDRA KUMAR, 2018). A porcentagem de inibição do ABTS⁺ é determinada a partir de um padrão Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), nas mesmas condições de análise do antioxidante (RE et al., 1999).

O método de FRAP é um método direto, de baixo custo e relativamente simples de medir a atividade antioxidante de compostos redutores (LORENZO et al., 2018). Os reagentes são estáveis e a sensibilidade e a precisão do método são altas não sendo alteradas por pequenas diferenças reacionais (BENZIE; DEVAKI, 2018). O ensaio permite a redução de íons férricos (Fe^{3+}) em íons ferrosos (Fe^{2+}) indicado por uma mudança de coloração.

Os peptídeos provenientes da caseína mostram atividades biológicas mais altas que os peptídeos do soro de leite (ESPEJO-CARPIO et al., 2013), cuja atividade depende também do seu peso molecular. Além disso, a atividade antioxidante dos hidrolisados de proteínas de soro de leite depende do peso molecular do peptídeo, sendo que peptídeos de baixo peso molecular apresentando maior atividade de eliminação de radicais *in vitro* (PENG et al., 2009; TERESITA et al., 2019).

De acordo com Suetsuna et al., (2000), a atividade antioxidante da caseína mostrou inibição a autooxidação lipídica catalisada por lipoxigenase, atuando como composto eliminador de radicais livres. Este seria o motivo pelo qual revestimentos à base de caseína são utilizados comercialmente para evitar o escurecimento induzido pela oxidação de frutas e legumes (KHAN et al., 2019). Assim como a caseína, a proteína do soro apresenta comprovação de atividade antioxidante por meio da inibição da oxidação lipídica (TONG et al., 2000). O mecanismo de ação ocorre por meio da quelação de metais de transição pela lactoferrina e à eliminação de radicais livres por aminoácidos contendo enxofre (MCCARTHY et al., 2001). O autor frisa que alimentos que contenham proteínas de soro de leite têm melhor atividade antioxidante quando comparados aos demais produtos lácteos (KHAN et al., 2019).

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Produtos derivados de leite apresentam uma reduzida vida útil devido aos nutrientes presentes na sua composição, além de elevada atividade de água, os quais tornam o ambiente propício ao desenvolvimento microbiano. Todas as etapas de processamento de requeijão e seus modelos devem ocorrer de acordo com os padrões de higiene, segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), nas quais o produto final deve apresentar condições

de segurança, com reduzido risco de contaminação por proliferação de micro-organismos deteriorantes (OLIVEIRA et al., 2014). Em queijos considerados frescos, pode-se citar como bactérias envolvidas na deterioração as *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp., *Clostridium butyricum*, *Clostridium tyrobutyricum* e *Clostridium sporogenes* e espécies psicotróficas Gram-negativas, tais como as *Pseudomonas* (KHORSHIDIAN et al., 2018; ROBINSON et al., 2005).

A segurança de alimentos é uma questão de importância para a indústria de alimentos, consumidores e saúde pública (MIAO et al., 2016). Ocasionalmente surgem surtos relacionados principalmente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes* (patógeno potencialmente de alto risco) (KHORSHIDIAN et al., 2018; KOUSTA et al., 2010).

Definidos como produtos químicos que inibem o crescimento de bactérias em concentrações determinadas, os agentes antimicrobianos apresentam ação por meio da inativação das enzimas celulares, inibição da síntese proteica e do DNA/RNA, além de alterações na permeabilidade das membranas celulares (BELDA-GALBIS et al., 2015; SHEN et al., 2014). Há indícios que os antimicrobianos surgiram a bilhões de anos, produzidos de forma natural por micro-organismos como meio de defesa (CLARDY et al., 2009; MACLEAN et al., 2010). Porém, apenas no século 20 se teve início a identificação e isolamento de compostos com atividade contra bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (OSBORN, 1943).

Exemplo de bactericidas naturais são os peptídeos antimicrobianos (AMP), sendo uma alternativa ao uso de antimicrobianos sintéticos (HANCOCK; CHAPPLE, 1999). Os mesmos podem ser encontrados em produtos lácteos (SIBEL AKALIN, 2014), especificamente em caseína e seus derivados, obtido a partir da ingestão e digestão gastrointestinal da proteína ou durante um processo fermentativo (LAHOV; REGELSON, 1996). O AMP mais conhecido e mais ativo de produtos lácteos é a lactoferricina B (BELLAMY et al., 1992).

3.7 CAPACIDADE QUELANTE

A capacidade de quelar metais de transição (Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+}) é um mecanismo de ação dos compostos antioxidantes, como mencionado no item 3.8. Os íons metálicos participam das reações de Fenton-Haber-Weiss ($\text{Fe}^{3+} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$; $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} -\text{OH} + \cdot\text{OH}$), movendo elétrons para a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (GONZÁLEZ-DURRUTHY et al., 2017; SANTOS et al., 2017). Pesquisas

publicadas em literatura demonstram a capacidade do LBA em sequestrar íons metálicos (ferro, cobre, cálcio, cromo e níquel) os quais atuam em reações de formação de radicais livres, causando a oxidação de lipídios insaturados (ABBADI et al., 1999; CHARLOUX et al., 1995; ISAACSON et al., 1989; MENABUE et al., 1998; PLAYNE; CRITTENDEN, 2009; ROLDÁN et al., 2004). A determinação da capacidade quelante de um extrato ou produto final é de importância para compreensão dos efeitos oxidativos causados quando ingeridos. O princípio básico por trás dessas técnicas é a utilização de vários agentes de dissociação química para seletivamente interromper uma interação baseada em proteínas no queijo processado. Isso resulta na solubilização da proteína que estava envolvida na interação.

A quantidade de proteína solúvel é quantificada com e sem a adição do agente de dissociação e é usado como um índice da importância relativa de cada interação baseada em proteína. Os vários agentes químicos de dissociação desestabilizam as interações baseadas em proteínas de maneiras diferentes. Interações hidrofóbicas são desestabilizados pelo dodecil sulfato de sódio. As ligações de hidrogênio são rompidas pela ureia, enquanto o etilenodiaminotetraacetato (EDTA) ajuda a quebrar a eletrostática mediada por cálcio (KEIM; HINRICHS, 2004; LEFEBVRE-CASES et al., 1998; MARCHESSEAU; CUQ, 1995).

Uma técnica de titulação ácido-base tem sido usada para avaliar a capacidade de quelação de cálcio de diferentes sais, bem como o estado final de cálcio no processo queijos fabricados usando diferentes sais emulsionantes (MIZUNO; LUCEY, 2005a; SHIRASHOJI et al., 2006). O princípio básico envolvido nesta técnica é que as soluções diluídas de queijo processado são tituladas usando um ácido seguido de uma base (a uma taxa constante) e a capacidade de tamponamento da solução de queijo processado é medida em diferentes valores de pH (HASSAN et al., 2004).

O cálcio ionizado, comumente disponível, apresenta limitações de absorção devido à precipitação quando o intestino encontra-se em meio básico (VAVRUSOVA; SKIBSTED, 2014). Quando o cálcio é quelado ele torna-se resistente às variações de pH decorrentes do processo digestivo permanecendo solúvel para completa absorção (SUN et al., 2016). Para que essa absorção ocorra o cálcio quelado necessita de compostos ligantes, como por exemplo, peptídeos (SUN et al., 2016). Os mesmos necessitam pouca energia e aceleram o transporte para o interior das células (RÉRAT et al., 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O estudo foi executado nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), na cidade de Curitiba – PR. Os modelos de requeijão cremoso foram preparados utilizando caseína em pó sabor neutro (Mais Nutrition), *whey protein* concentrado sabor neutro (Mais Nutrition), creme de leite fresco (Verde Campo, Brasil), sais de fusão (Avante Ingredientes®, Brasil), cloreto de Sódio P.A (NaCl) (Vetec), e como acidificante ácido láctico 85 % (Alphatec) e/ou ácido lactobiônico 97 % (Syngars Technology Co., LTDA) e água destilada.

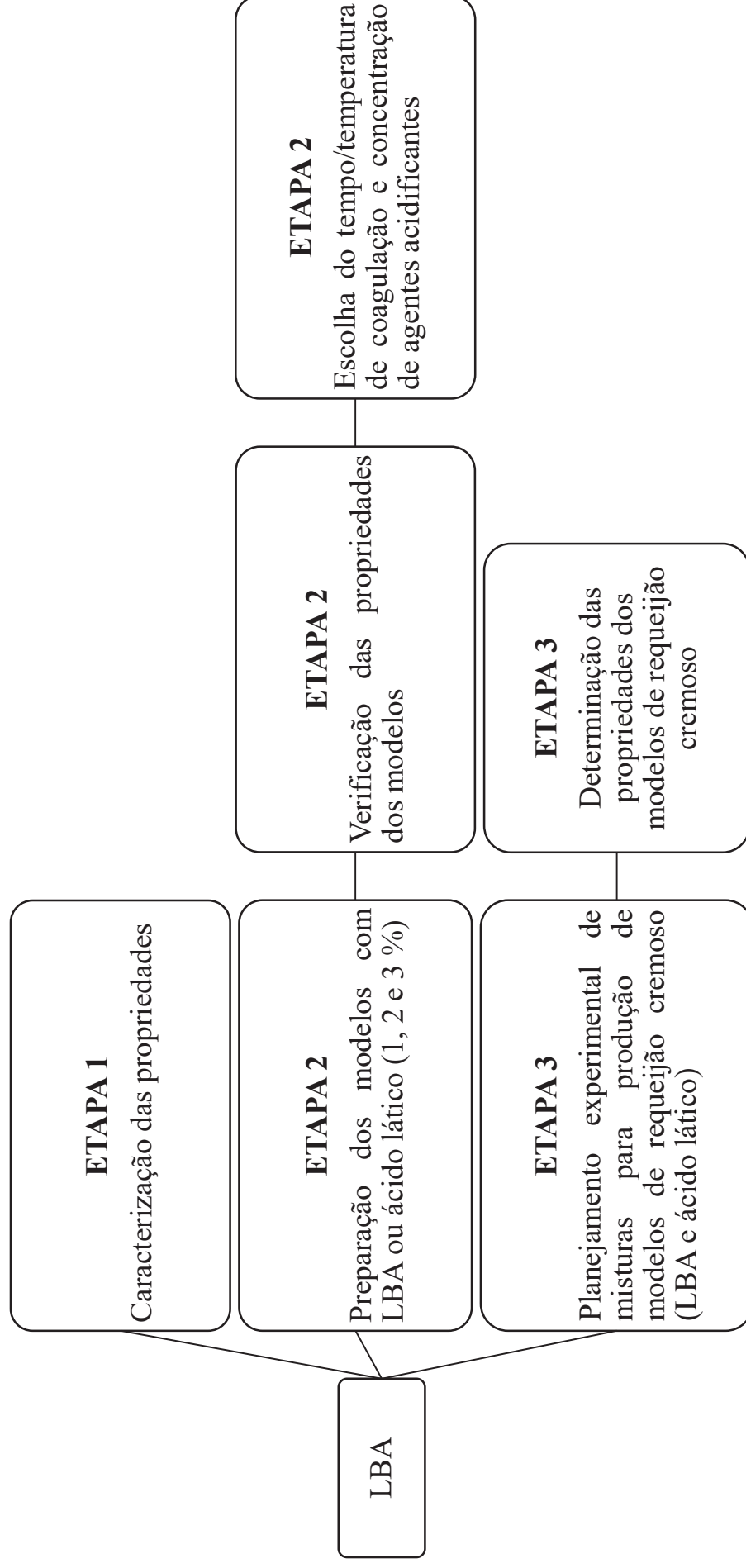
Para a execução das análises do LBA e análises dos modelos de requeijão cremoso foram utilizados os seguintes reagentes: ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Sigma-Aldrich), DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazilo) (Sigma-Aldrich), ferroZine (Sigma-Aldrich), TPTZ - 2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-S-Triazine (Sigma-Aldrich), ácido clorídrico (NEON), acetato de sódio (NEON), sulfato de ferro II heptahidratado (NEON), murexida (NEON), persulfato de potássio (NEON), sulfato de amônio ferroso (NEON), ácido acético glacial (Êxodo científica), cloreto férrico hexahidratado (Vetec), (Vetec), hidróxido de sódio (Vetec), ágar e caldo Muller-Hinton (Kasvi), cloranfenicol 0,12 % (Colgate), cloreto de cálcio (Alphatec), EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) (Biotec), biftalato de potássio (Biotec), etanol absoluto (Biotec), fenolftaleína (Synth), nitrato de prata (Synth) e trolox (Acros Organics).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Resumo esquemático dos métodos aplicados

Inicialmente o aditivo alimentar de estudo (LBA) foi caracterizado quanto às suas propriedades (etapa 1) para que sequencialmente fosse aplicado na produção de modelos de requeijão cremoso. A produção dos modelos foi baseada em um estudo da influência dos parâmetros tempo, temperatura e concentração de agente acidificante (etapa 2) no processo de coagulação das amostras, para obtenção das melhores condições de processamento. Por fim, os modelos de requeijão cremoso foram produzidos de acordo com um planejamento experimental de misturas para avaliar exclusivamente a proporção dos agentes acidificantes (etapa 3) sobre as propriedades do produto final (FIGURA 3).

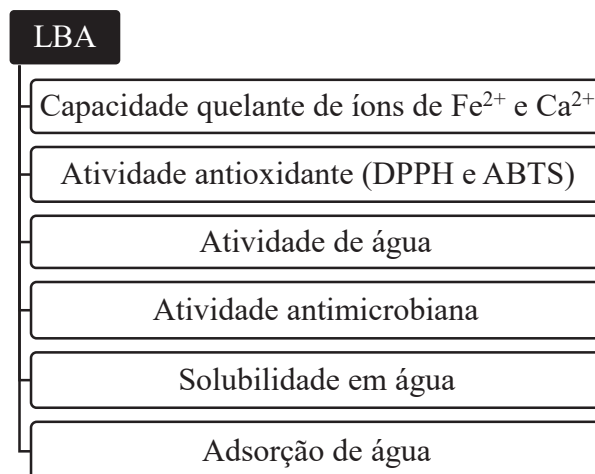
FIGURA 3 – DIAGRAMA CONCEITUAL DO ESTUDO



FONTE: A autora (2020).

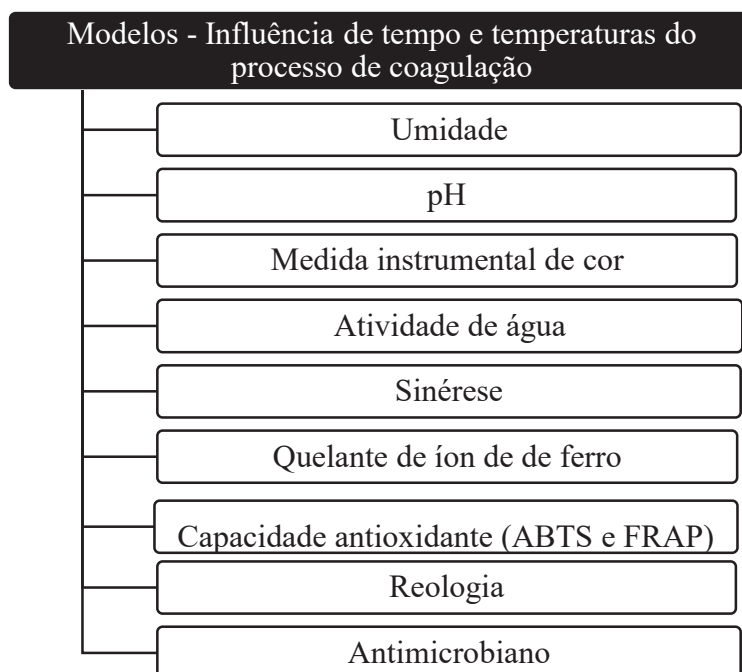
Para cada uma das três etapas realizadas, algumas análises de caracterização foram realizadas. As análises referentes às etapas mencionadas estão esquematizadas nas FIGURAS 4, 5 e 6.

FIGURA 4 – ANÁLISES REALIZADAS COM O LBA (ETAPA 1)



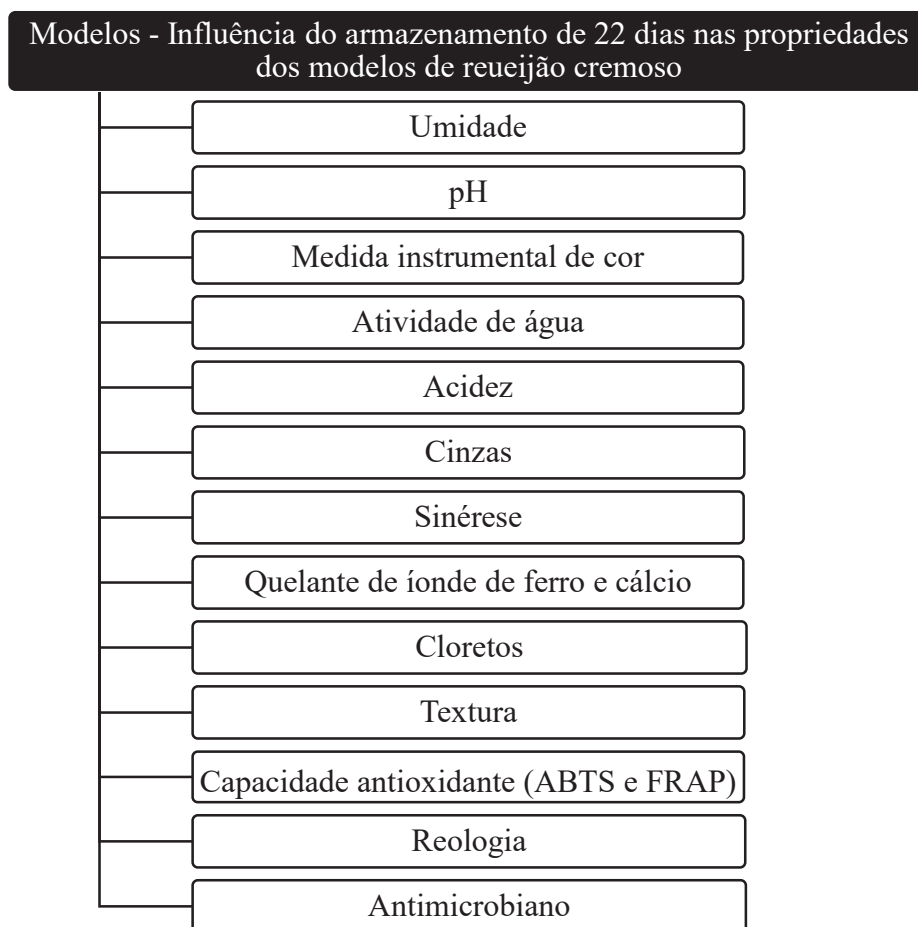
FONTE: A autora (2020).

FIGURA 5 – ANÁLISES REALIZADAS COM O MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO (ETAPA 2)



FONTE: A autora (2020).

FIGURA 6 - ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS REALIZADAS NAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO DURANTE PERÍODO DE ARMAZENAMENTO (ETAPA 3)



FONTE: A autora (2018).

4.2.2 Preparo das amostras

4.2.2.1 Preparo do LBA para quantificação de suas propriedades

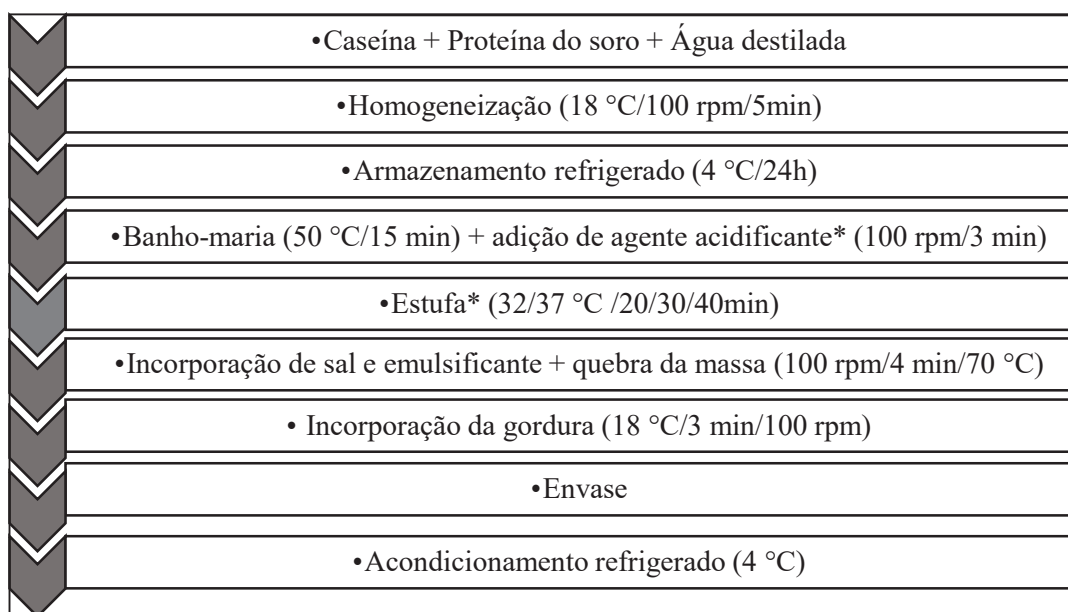
A amostra foi preparada por meio da diluição de 4 g do LBA em 10 mL (400 mg.mL^{-1}) de água destilada. A mistura foi agitada vigorosamente e colocada em banho-maria por 3 h a 50°C . Para análises como DPPH, ABTS e capacidade antimicrobiana, diluições seriadas da solução principal foram realizadas.

4.2.2.2 Produção dos modelos de requeijão cremoso

Inicialmente as proteínas foram reconstituídas em água deionizada com agitação a 100 rpm/5 min e a mistura foi armazenada sob refrigeração ($24 \text{ h}/4^\circ \text{C}$ para hidratação). A incorporação do agente acidificante foi realizada após 15 min de banho-maria a 50°C , com

homogeneização (100 rpm/3 min). As amostras foram mantidas em estufa para coagulação, conforme planejamento experimental. Sequencialmente, à massa foram incorporados o sal e o agente emulsificante, sendo a mistura homogeneizada sob agitação e aquecimento (100 rpm/4 min /70 °C). A gordura foi incorporada à massa no fim do processo (homogeneização por 3 min a 100 rpm). O armazenamento dos modelos de requeijão já prontos foi realizado em refrigerador a 4 °C em embalagem plástica de diâmetro 8,5 cm com tampa. A FIGURA 7 ilustra as etapas realizadas para a produção do requeijão cremoso.

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DE PROCESSAMENTO DO MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO



*De acordo com planejamento experimental (TABELA 5).

FONTE: A autora (2019).

4.2.3 Influência de tempo, temperatura e concentração de acidulante utilizado no processo de coagulação (ETAPA 2)

Os modelos de requeijão foram produzidos de acordo com a FIGURA 7 utilizando-se dois diferentes acidificantes (LBA e ácido láctico, ambos na concentração de 85 %). O planejamento experimental inteiramente casualizado totaliza 18 experimentos para o LBA (2 temperaturas*3 tempos*3 concentrações) e 18 experimentos para o ácido láctico (totalizando 36 experimentos) (TABELA 5). As amostras formadas passaram por análise visual, umidade, pH, cor, sinérese, atividade de água (aw) e reologia. Uma amostra controle comercial (Requeijão cremoso Nestle® - Ingredientes: creme de leite, leite pasteurizado integral, proteína

concentrada de leite, caseinato de cálcio, concentrado de proteínas lácteas, água, sal, cloreto de cálcio, fermento lácteo, estabilizantes, regulador de acidez ácido láctico e conservador sorbato de potássio) foi utilizada como comparativo às demais amostras. Seis amostras foram escolhidas de acordo com os resultados dos parâmetros analisados para seguir para análise de capacidade quelante de ferro, antioxidante (ABTS e FRAP) e antimicrobiana. Por meio dos resultados foram estabelecidas as melhores condições de processamento (tempo, temperatura de coagulação e concentração de ácido) do modelo de requeijão cremoso.

TABELA 5 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL INTEIRAMENTE CASUALIZADO PARA ESTABELER A INFLUÊNCIA DE TRÊS PARÂMETROS NO PROCESSO DE COAGULAÇÃO DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO (ETAPA 2)

Amostra	Tempo de coagulação (min)	Temperatura de coagulação (°C)	Concentração de LBA ou ácido láctico (%)
A	20	32	1
B	30	32	
C	40	32	
D	20	37	
E	30	37	
F	40	37	
G	20	32	2
H	30	32	
I	40	32	
J	20	37	
K	30	37	
L	40	37	
M	20	32	3
N	30	32	
O	40	32	
P	20	37	
Q	30	37	
R	40	37	

FONTE: A autora (2019).

A partir dos testes preliminares (FIGURA 5) foi estabelecida a formulação base para o processamento dos modelos de requeijão, a qual se encontra descrita na TABELA 6.

TABELA 6 – FORMULAÇÃO DO MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO

Ingrediente	(%)
Caseína + <i>whey protein</i>	17
Creme de leite fresco	32
Ácido láctico/LBA	1/2/3
NaCl	1
Sais de fusão	1
Água destilada	46/47/48

FONTE: A autora (2019).

4.2.4 Delineamento de experimentos para os modelos de requeijão cremoso

Todas as amostras testadas seguiram a formulação apresentada na Tabela 6. A diferença estabelecida entre as formulações é observada apenas nos compostos de acidificação direta (ácido láctico ou LBA e a proporcionalidade de misturas entre eles) de acordo com a Tabela 6. O planejamento de misturas para os agentes acidificantes foi realizado por meio de um delineamento Simplex centroide aumentado para misturas de dois componentes, com dois pontos interiores, resultando em 5 experimentos, como mostrado na TABELA 7.

TABELA 7 – PLANEJAMENTO SIMPLEX CENTRÓIDE AUMENTADO PARA MISTURA DE COMPONENTES

Mistura	Proporções dos componentes codificados		Proporções dos componentes reais	
	Ácido láctico	LBA	Ácido láctico (%)	LBA (%)
I	1,00	0,00	100	0
II	0,00	1,00	0	100
III	0,50	0,50	50	50
IV	0,75	0,25	75	25
V	0,25	0,75	25	75

FONTE: A autora (2019).

As análises nos modelos de requeijão foram realizadas durante o período de armazenamento (dias 1, 8, 15 e 22) para todas as amostras produzidas, em temperatura ambiente média de 20 °C e umidade relativa média de 82 %.

4.2.5 Análises realizadas

As análises para os modelos de requeijão e LBA foram realizadas de acordo com o Quadro 1. Sendo o símbolo  representante de análise realizada e o símbolo  representante de análise não realizada.

QUADRO 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ANÁLISES REALIZADAS NO LBA E NAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO

LBA	Análises	Modelo de requeijão cremoso
	Adsorção	
	Solubilidade em água	
	Umidade	
	pH	
	Cinzas	
	Cloretos	
	Acidez Titulável	
	Análise Colorimétrica	
	Sinérese	
	Reologia	
	Textura	
	Rendimento	
	Atividade de Água	
	Atividade Quelante	
	Atividade Antioxidante	
	Atividade antimicrobiano	
	Estatística	

4.2.5.1 Adsorção

Foi determinada por meio de metodologia adaptada de Koç et al. (2014). A amostra úmida de LBA (1 g) foi pesada em cadinhos de alumínio e secas (35 °C/72 h) para a retirada de toda a umidade natural do material. Sequencialmente as amostras foram colocadas em dessecadores com umidade relativa controlada por soluções saturadas de sal, NaCl (75,3 % Umidade Relativa - UR) e BaCl₂ (90 % UR), por duas semanas. O resultado foi expresso em porcentagem. As células foram pesadas a cada 24 horas para a obtenção da umidade de equilíbrio.

4.2.5.2 Solubilidade em água

A análise gravimétrica baseia-se na medida indireta da massa de um ou mais constituintes de uma amostra. Em tubos de ensaio foram pesadas quantidades variáveis (30 - 1500 mg) de ácido orgânico (LBA) e adicionados sequencialmente de 3 mL de água destilada como solvente. Os tubos foram agitados em vortex (Biomixer®) por 30 s. Decorrido o período de agitação, o sistema foi mantido em repouso (sem agitação) em banho termostatizado à temperatura constante de 20 °C até a retirada das amostras (1 h). O precipitado foi filtrado e seco em estufa para posteriormente ser pesado.

4.2.5.3 Determinação de umidade e pH

A umidade foi determinada em estufa a 100 °C durante 24 h pelo método gravimétrico após a secagem de aproximadamente 5 g de amostra de modelo. Para a determinação do pH foi utilizado um potenciômetro digital inserido diretamente nas amostras (AOAC, 2005).

4.2.5.4 Determinação de cinzas e cloretos

O resíduo mineral fixo foi medido por incineração da amostra de modelo de requeijão a 550 °C (AOAC, 2005). Os cloretos foram determinados utilizando o método argentométrico de titulação dos íons cloretos com nitrato de prata (AgNO₃) com precipitação na forma de cloreto de prata em pH alcalino (ALMEIDA et al., 2016). Como composto indicador usou-se dicromato de potássio (K₂CrO₄). O método consistiu em pesar o resíduo mineral em erlenmeyer de 125 mL, incorporar 50 mL de água morna. A esta solução (10 mL) foi adicionado cromato de potássio a 5 % (m/v) (1 mL) e realizou-se na sequência a titulação com nitrato de prata 0,1 N. O fim da titulação ocorre quando há formação de precipitado de coloração vermelho tijolo. O resultado foi calculado pela equação (1):

$$\%NaCl = \frac{V \times N \times f \times 0,0584 \times 100}{m} \quad (1)$$

Onde:

V = volume da solução de nitrato de prata 0,1 N gasto na titulação em mL;

N = normalidade da solução de nitrato de prata 0,1 N;

f = fator de correção da solução de nitrato de prata 0,1 N;

m = massa da amostra em gramas;

0,0584 = milequivalente-grama do cloreto de sódio.

4.2.5.5 Acidez Titulável

A acidez titulável foi determinada usando método de titulação com NaOH (0,1M) (AOAC, 2005). Para isso 10 g de amostra de modelo de requeijão foi adicionado em 100 mL de água destilada, com adição de 5 gotas de solução de fenolftaleína (1 %). Cada amostra foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até o aparecimento de uma coloração rósea. A acidez final foi determinada aplicando a equação (2) (% m/v de ácido láctico).

$$\% \frac{m}{v} \text{ Ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{A} \quad (2)$$

V = mL de solução de NaOH (0,1M) gastos na titulação.

f = fator de correção da solução de NaOH (0,1M).

A = g de amostra.

0,9 = fator de conversão para ácido láctico.

4.2.5.6 Análise colorimétrica

A determinação da medida instrumental de cor foi realizada em colorímetro (Hunterlab, Miniscan EZ, EUA) operando no sistema CIELab (L^* , a^* , b^*). As medidas foram realizadas apoiando-se a abertura do aparelho próximo a superfície das amostras com o equipamento previamente calibrado (em temperatura ambiente). No sistema CIELab, a coordenada “ L^* ” expressa o grau de luminosidade, da cor medida [$L^* = 0$ (preto) a 100 (branco)]; os valores de “ a^* ” expressam o grau de variação entre o vermelho e o verde [$a^* (+)$ = vermelho, $a^* (-)$ = verde]; e a coordenada “ b^* ” expressa o grau de variação entre a cor azul e o amarelo [$b^* (+)$ = amarelo, $b^* (-)$ = azul] (STANCIL; JORDAN, 1985). O Croma é a cor real do produto sendo calculado por meio da relação entre os valores de a^* e b^* . A saturação da cor foi estabelecida

pelo ângulo Hue formado entre a^* e b^* . O Croma e o ângulo Hue foram determinados por meio das respectivas fórmulas, (3) e (4):

$$Croma = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (3)$$

$$\text{Ângulo Hue} = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (4)$$

4.2.5.7 Sinérese

A determinação da sinérese nas amostras de modelos de requeijão cremoso foi realizada utilizando metodologia adaptada de Lemes et al. (2016). Amostras de 5 gramas foram pesadas em tubos Falcon e centrifugadas 5 vezes por 40 minutos a $6,440 \times g$. O soro resultante de cada centrifugação foi coletado e quantificado para cálculo de acordo com a equação (5).

$$\text{Sinérese (\%)} = 100 \times \frac{\text{massa}_{\text{soro final}}}{\text{massa}_{\text{amostra}}} \quad (5)$$

4.2.5.8 Reologia

As medidas reológicas dos modelos de requeijão cremoso foram realizadas em reômetro rotacional (R/S-CC +, Brookfield Engineering, MA, EUA) equipado com um cilindro coaxial controlado por taxa de cisalhamento (CC45) dotado de camisa com circulação de água com temperatura controlada e ajustada para 10°C em banho ultratermostático. Antes da realização dos experimentos, foi feita a aplicação de uma taxa de cisalhamento constante de 100 s^{-1} por 3 min para a ruptura da tixotropia (VIDIGAL et al., 2012). A viscosidade aparente das amostras dos modelos de requeijão (100 mL) foi avaliada por meio de aplicação de uma taxa de cisalhamento programada (γ) com aumento de 0,1 para 300 s^{-1} nos primeiros 5 minutos (curva ascendente) e retornou para $0,1 \text{ s}^{-1}$ nos 5 minutos seguintes (curva descendente) (PEREIRA et al., 2016). Os valores de tensão de cisalhamento e viscosidade aparente foram obtidos a cada 12 s, resultando em 50 pontos. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O comportamento reológico das amostras foi caracterizado pela tensão de cisalhamento versus a taxa de cisalhamento, e três modelos foram utilizados: Ostwald-de-Waele (9), Herschel-Bulkley (10) e plástico de Bingham (11).

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (9)$$

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \gamma^n \quad (10)$$

$$\tau = \tau_B + \eta_B \cdot \gamma \quad (11)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}), K é o índice de consistência, τ_0 é a resistência ao escoamento, n é o índice de comportamento do fluxo e η_B é a viscosidade plástica de Bingham.

4.2.5.9 Medida instrumental de textura

As propriedades de textura dos requeijões foram determinadas por meio da análise de perfil de textura, utilizando como equipamento o analisador de textura Brookfield CT3 (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, EUA), equipado com célula de carga de 25 kg. As determinações dos parâmetros de textura das amostras foram realizadas nos dias (1, 8, 15 e 22) em replicata (4 vezes por amostra), utilizando como recipiente a própria embalagem do produto, mantida a 10 ± 1 °C até o momento da análise.

O perfil de textura dos queijos foi determinado por meio de teste de dupla compressão de amostras com massa constante. As características texturais medidas foram dureza (N), mastigabilidade (J), coesividade (adimensional), elasticidade (mm) e gomosidade (N), empregando os seguintes parâmetros: compressão de 60 % (de força) da amostra; velocidade de teste: 1,0 mm/s; tempo de contato de 5 s, utilizando sonda cônica acrílica TA-2 de 60° (Texture Technologies Corp. and Stable Micro Systems, Hamilton, MA), de 30 mm de diâmetro e 36 mm de altura, em analisador de textura CT3 Texture Analyzer (Brookfield AMETEK, Middleboro, MA, USA).

4.2.5.10 Rendimento

O rendimento percentual de cada tratamento foi calculado por meio da relação entre a massa final do modelo (em kg) e a massa inicial do modelo (kg).

4.2.5.11 Atividade de água (aw)

Para a avaliação da atividade de água utilizando-se a técnica de determinação de ponto de orvalho, a amostra foi colocada em cápsula descartável própria do equipamento Aqualab 3TE em quantidade suficiente para cobrir o fundo (aproximadamente 1,5 g). A atividade de água foi obtida por leitura direta no equipamento (precisão de $\pm 0,003$), em triplicata, na temperatura ambiente local, de 20 °C (HICKEY et al., 2013).

4.2.6 Extração dos compostos dos modelos para análises subsequentes

A extração dos compostos do modelo de queijo foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Prudencio et al. (2008). De cada amostra analisada foi retirado 3 g e adicionado a 30 mL de etanol 80%. Após um período de agitação de aproximadamente 5 minutos o conteúdo foi armazenado por 72 h em temperatura ambiente, centrifugado (3 h- $6,440 \times g$) e filtrado em papel filtro. A partir da amostra obtida foram feitas diluições e procedidas as análises

4.2.7 Atividade Antioxidante (FRAP)

A atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP) foi determinada utilizando metodologia descrita por Rufino et al., (2007). O reagente FRAP foi obtido pela junção de tampão acetato 0,3 M, solução de TPTZ 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. O ensaio foi realizado por meio da adição de diferentes concentrações da amostra, água destilada e reagente FRAP. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C durante 30 min, com posterior leitura da absorbância (595 nm). O ajuste linear foi obtido por meio de uma curva de calibração com diferentes concentrações de uma solução padrão de sulfato ferroso. O resultado foi expresso em μM sulfato ferroso/g de amostra.

A medida da capacidade sequestrante de radicais livres DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilidrazilo) do LBA foi realizada em triplicata, de acordo com metodologia descrita por Chun et al., (2005) com pequenas modificações. Alíquota de 1 mL da diluição da amostra foi adicionada à 3 mL de solução etanólica de DPPH (150,45 μM), previamente preparada, agitada e armazenada em frasco âmbar, por 15 min. Como controle foi adicionado 1 mL de etanol 80 % (em substituição a solução de LBA) a 3 mL da solução etanólica de DPPH (150,45 μM). A água destilada foi usada como branco, para zerar o equipamento (espectrofotômetro model nova 5600 UV). A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 517 nm. A partir de uma solução de DPPH de concentração 0,25 μM foram realizadas oito diluições utilizadas para formar a curva padrão. A atividade de eliminação do radical livre foi calculada usando a equação (6):

$$\text{Atividade antioxidante (\% de inibição)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs } 517 \text{ nm amostra}}{\text{Abs } 517 \text{ nm controle}} \right) \right] \times 100 \quad (6)$$

O método de sequestro de radicais ABTS empregado foi baseado no reportado por Re et al., (1999), com modificações. A solução ABTS foi preparada dissolvendo 0,0234 g de ABTS

em 6 mL de água destilada (7 mM) com armazenagem em frasco âmbar. O radical ABTS foi preparado incorporando 1 mL de uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM (6,62 mg de persulfato de potássio+10 mL de água destilada) em 1 mL da solução de ABTS em estoque com banho a 50 °C por 15 minutos. Na sequência esta solução foi corrigida para atingir uma absorbância de 0,7 nm (leitura em 734 nm). A solução de radical ABTS (7 mL) foi adicionada as amostras diluídas em triplicata (1 mL) e incubado por 30 min após homogeneização. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 734 nm. A partir de uma solução padrão de trolox (2000 µM) foram obtidas sete diluições para a construção da curva padrão. Alíquotas de 1 mL de cada diluição do trolox foi transferida para tubos de ensaio contendo 7 mL da solução do radical ABTS e a leitura foi realizada após 30 minutos da mistura (734 nm). Um ajuste linear foi feito para a obtenção do resultado em µmol TE.L⁻¹, por meio da equação (7):

$$y = -ax + b \quad (7)$$

onde: y= absorbância correspondente a 1000 µM de trolox; x= Diluição da amostra (mg.L⁻¹) referente ao trolox *TE - trolox equivalente

4.2.8 Atividade quelante

As soluções utilizadas para a determinação da capacidade quelante do íon ferro, foram preparadas de acordo com metodologia descrita por Harb et al. (2016), com adaptações. A solução de ferrozina 5 mmol foi preparada utilizando-se 19,7 mg de ferrozina em 8 mL de água destilada. Para se obter uma solução de sulfato de amônio ferroso na concentração de 2 mmol foi pesado 2,4 mg de sulfato de amônio ferroso em 3 mL de água, considerando massa molar de 392,14 g.mol⁻¹. Para estabelecer as proporções utiliza-se a equação (8):

$$Concentração\ Final = \frac{\frac{Sulfato\ de\ Amônio\ ferroso\ (g)}{Volume\ de\ água\ (L)}}{MM\ ((NH_4)Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O\ (g/mol))} \times 10^3 \quad (8)$$

A atividade quelante do Fe²⁺ foi determinada medindo-se a formação de um complexo de Fe²⁺ com ferrozina de acordo com metodologia adaptada de Tang et al. (2002). As amostras foram previamente diluídas em água com concentração variando de 15 a 400 mg.mL⁻¹ e na sequência 1 mL da amostra foi adicionado de 0,1 mL de sulfato de amônio ferroso (2 mmol). Após incubação por 30 min à temperatura ambiente e frasco âmbar, foi adicionado a ferrozina

(0,2 mL, 5 mmol) com incubação de mais 10 minutos e na sequência a amostra foi completada com água, totalizando 5 mL. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 562 nm. Como branco utiliza-se apenas água e o $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ausência da amostra) e como controle a amostra foi substituída por água, sendo o volume final padronizado (TABELA 8). A atividade quelante foi calculada por intermédio da equação (9):

$$\text{Atividade Quelante } \text{Fe}^{2+}\% = \left[\left(\frac{\text{Abs}_{\text{Controle}} - \text{Abs}_{\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{\text{Controle}}} \right) \right] \times 100 \quad (9)$$

TABELA 8 – VOLUMES NECESSÁRIOS DOS COMPONENTES PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE QUELANTE DO EXTRATO E AMOSTRA EM ESTUDO (Fe^{2+})

	Amostra Diluída (mL)	Água destilada da reação (mL)	Água destilada incorporada (mL)	Sulfato de amônio ferroso (mL)	Ferrozina (mL)	Volume Final (mL)
Amostra	1	3,7	-	0,1	0,2	5
Branco	-	3,7	1,2	0,1	-	5
Controle	-	3,7	1	0,1	0,2	5

FONTE: A autora (2019)

A capacidade de quelação do ferro está relacionada de forma inversa a leitura da intensidade de coloração estabelecida pela absorbância. Para traçar a curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de EDTA (0,1-0,0125 mg.mL^{-1}). A metodologia aplicada segue adaptações de Tang et al. (2002), como mencionado anteriormente, porém com substituição das diferentes concentrações de amostra por soluções de diferentes concentrações de EDTA. O valor de absorbância medido para o branco foi descontado da absorbância de cada um dos pontos da curva padrão. A curva foi plotada relacionando a concentração de EDTA (eixo x) pela absorbância estabelecida (eixo y).

Para a determinação da capacidade quelante frente ao íon cálcio, a amostra (1 mL) previamente diluída em água (400 mg.mL^{-1}) à temperatura ambiente foi adicionada de 3 mL de NaOH (1 mol.L^{-1}) e homogeneizada. Sequencialmente a mistura recebeu 1 mL de cloreto de cálcio (50 mM) com agitação de 150 rpm/1 h/37 °C. Posteriormente, foi incorporado a murexida como indicador de cálcio (20 μL). A solução foi titulada com EDTA 0,01 M até a mudança de coloração, de rosa para roxo (o volume de EDTA gasto foi registrado, sendo este valor designado por V_1 na Equação 8). Sequencialmente, a solução foi adicionada de etanol absoluto

até turvação, seguido de centrifugação a $6,440 \times g$ durante 1 h. O precipitado foi retirado, dissolvido em água destilada (1 mL), incorporado de 3 mL de NaOH (1 mol.L⁻¹) e adicionada de indicador murexida (20 µL). A solução foi titulada com EDTA até o ponto de viragem, sendo o volume de EDTA gasto correspondente ao volume de cálcio ligado (V₂). Os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão. O cálculo da capacidade quelante dos íons cálcio foi calculado pela equação (10):

$$\text{Atividade Quelante Ca}^{2+}\% = \left(\frac{V_2}{V_1}\right) \times 100 \quad (10)$$

sendo que V₁ corresponde ao volume gasto na titulação para estabelecer a quantidade total de cálcio e V₂ corresponde ao volume gasto na titulação para determinar a quantidade de cálcio ligado.

4.2.9 Potencial Antimicrobiano

O potencial antimicrobiano foi realizado pela técnica de disco-difusão de acordo com metodologia adaptada de Bauer et al. (1966). A técnica consiste em aplicar um determinado volume de extrato diluído em diferentes concentrações, em discos de papel de filtro e colocá-los sob o meio de cultura utilizado.

As cepas padrões utilizadas para as análises foram: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Inicialmente as bactérias foram reativadas em caldo Muller Hinton a 37 °C por 24 h. Na sequência os inóculos foram coletados com auxílio de alça de repicagem e transferidos para solução salina (0,9 %) até atingir concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹, equivalente à solução padrão de McFarland de 0,5 (80 % de transmitância) (BAUER et al., 1966).

O ágar Muller Hinton (25 mL) foi suspenso em placas de Petri, inoculadas em superfície utilizando swab estéril com 0,1 mL das suspensões microbianas (10⁸ UFC.mL⁻¹). Na superfície do ágar inoculado foram adicionados os discos de 2 mm de diâmetro embebidos nas respectivas diluições de LBA (20 µL). Como controle positivo foi utilizado discos incorporados de cloranfenicol 0,12 % e como controle negativo foi utilizado etanol 80 %. As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 h. A determinação da inibição do crescimento microbiano foi feita por meio da medida dos halos inibitórios.

4.2.10 Análise estatística

As análises de umidade, pH, cinzas acidez, medida instrumental de cor, cloretos, reologia, atividade antioxidante, atividade de água e sinérese foram feitas em triplicata e expressas por médias seguidas dos seus respectivos desvios padrões. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a normalidade dos resultados obtidos, o teste de Levene para verificar a homogeneidade de variâncias e ANOVA para verificar a diferença estatística entre as médias dos dados gerados, utilizando fator único com 95 % de significância para o valor de p. O teste de Tukey foi usado para comparação das médias, considerando o valor de $p < 0,10$ como significativos. Para a realização do tratamento dos dados obtidos foi utilizado o programa Excel (Microsoft) juntamente com o suplemento de estatística (EQUIPE ESTATCAMP, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ÁCIDO LACTOBÍÔNICO

5.1.1 Adsorção e atividade de água

Na temperatura de ensaio de 25,2 °C a a_w foi de $0,42 \pm 0,003$ e a adsorção variou de acordo com a umidade relativa (TABELA 9). Foi possível observar que quanto maior a umidade relativa do ambiente maior a quantidade de água retida na estrutura do LBA. A capacidade de adsorção do LBA é maior do que a do ácido cítrico e ácido láctico, 1,30 e 1,53 respectivamente (PENG et al., 2001) utilizados na indústria alimentícia como ácido succínico, que de acordo com os mesmos autores apresenta ausência de adsorção em UR de 90 % (PHARMANOSTRA, 2017).

TABELA 9 – ADSORÇÃO PARA AMOSTRA DE LBA

Umidade Relativa (%)	Adsorção (%)
75	$21,56 \pm 0,18$
90	$45,55 \pm 1,34$

FONTE: A autora (2019).

Estudos publicados na literatura mencionam que o LBA possui grupos funcionais capazes de formar interações de hidrogênio com a água permitindo a formação de uma estrutura gelatinosa em temperatura ambiente (20 °C) contendo 14 % de umidade (GUTIÉRREZ et al., 2012a; KOWALCZYK et al., 2012). Essa propriedade é uma característica dos oligossacarídeos aldônicos os quais podem ser utilizados com a finalidade de liberação lenta de compostos, como por exemplo, o cálcio em produtos alimentícios (YU; VAN SCOTT, 2004). Em 2004 foi registrada uma patente estabelecendo a formação de matrizes de gel de ácidos oligossacarídicos, entre eles o LBA. Neste estudo comprovou-se que ao preparar uma solução de 1 g de LBA em 1 mL de água com manutenção da temperatura em torno de 25 °C/72 h, ocorre a formação de gel devido a evaporação parcial e lenta da água e ao final do período estipulado o gel apresenta-se na forma de uma película clara e contínua contendo 86 % de LBA e 14 % de água (YU; VAN SCOTT, 2004).

Estudos comparativos entre agentes higroscópicos (glicerol (33 g.mol⁻¹), sorbitol (14 g.mol⁻¹), ácido glicólico (4 g.mol⁻¹), ácido cítrico (8 g.mol⁻¹) e ácido láctico (perdeu umidade ao invés que ganhar)) comprovam uma maior capacidade de retenção de água do LBA em

temperatura ambiente (20 °C) (54 g.mol^{-1}) (BRIDEN, 2004; GRIMES et al., 2004; PHARMANOSTRA, 2017). A retenção de umidade no presente estudo foi superior ao reportado na literatura, atingindo valor de $77,25 \text{ g.mol}^{-1}$. Em 2012, o composto foi estudado para aplicação em produtos cárneos com a finalidade de reter umidade após um ciclo de congelamento e descongelamento com resultado positivo frente às amostras controle (GUTIÉRREZ et al., 2012a; NIELSEN, 2012).

Estabelecendo uma relação entre a utilização do LBA e produtos alimentícios, sua aplicação ficaria restrita a produtos onde é desejável a retenção de umidade e a absorção de umidade do ambiente, caso a embalagem não impeça a troca com o exterior. Ao absorver umidade com a eficiência demonstrada pelo LBA, ele acaba por agir como agente de textura nas amostras de requeijão cremoso.

5.1.2 Solubilidade

A elevada interação com a água permite que o LBA apresente como propriedade solubilidade em meio aquoso. Estudos relatam que o sal de cálcio que origina o LBA apresenta solubilidade maior quando comparado ao citrato (65 vezes maior), lactato (6,4 vezes maior), gluconato (16,3 vezes maior) e carbonato de cálcio (28 mil vezes maior) (GUTIÉRREZ et al., 2012a; NAKANO; KIRYU; KISO, 2010).

Os certificados de análise do composto estabelecem seu grau de solubilidade em água com valores de 10 a 100 mg.mL^{-1} à 20 °C (CHEMICAL BOOK, 2016; SIGMA-ALDRICH, 2018). No presente estudo foi possível solubilizar uma solução de concentração de 400 mg.mL^{-1} (40 %) de LBA em água após repouso de uma hora (20 °C). Sua solubilidade permite ampla aplicação na indústria alimentícia, de modo a disponibilizar o cálcio e auxiliar no enriquecimento de produtos, como queijos e requeijões (BALDWIN et al., 2010; GUTIÉRREZ; HAMOUDI; BELKACEMI, 2012a; KOUTINA; KNUDSEN; SKIBSTED, 2015). Entretanto, o valor obtido para a solubilidade do LBA corresponde a $1,13 \text{ mol}$ do soluto por kg de água, sendo este valor inferior à solubilidade de outros aditivos alimentares como NaCl, frutose, ácidos cítrico e málico e a sacarose, que apresentam massa molar muito próxima à do LBA e solubilidade de aproximadamente 6 mol.kg^{-1} de água (temperatura - 25°C) (DUPAS-LANGLET et al., 2017).

5.1.3 Atividade antioxidante e quelante

O presente estudo avaliou a capacidade antioxidante do LBA em diferentes concentrações utilizando dois métodos. Os resultados indicam uma redução da capacidade antioxidante diante da redução da concentração do composto. Observa-se que o método ABTS apresentou resultados variando entre 56,150 e 1,025 % de capacidade antioxidante enquanto pelo método de DPPH os resultados variaram entre 24,230 e 3,958 %, como mostrado na TABELA 10.

O resultado pode ser justificado pela estrutura química do LBA. Compostos cuja estrutura química apresenta um grupo carboxílico (preferencialmente ligado a um carbono não aromático) próximo a grupos hidroxil (neutros) normalmente são compostos quelantes de metais e de ação antioxidante, como é o caso de grande parte dos PHAs (Poli-hidroxi ácidos), alguns AHAs (alfa-hidroxi ácidos), BHAs (beta-hidroxi ácidos) e ácidos aldônicos (KORNHAUSER et al., 2010). O LBA possui grupos –OH ativos, como já mencionado, que podem exercer essa atividade, e adicionalmente, uma estrutura cíclica que pode auxiliar e estabilizar o deslocamento de elétrons. Dessa forma, os agentes quelantes formam complexos solúveis em água, onde íon metálico é envolvido por ligações covalentes do agente quelante.

TABELA 10 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO LBA: RESULTADOS DADOS EM % E CONCENTRAÇÃO EM EQUIVALENTE TROLOX (TE)

Concentração (mg.mL ⁻¹)	DPPH (% de inibição)	Quelante Ferro (%)	Quelante Cálcio (%)
400	24,23 ^A ± 0,30	54,81 ^A ± 0,75	15,16 ± 2,67
300	21,15 ^B ± 0,50	35,15 ^B ± 0,34	-
150	14,39 ^C ± 0,07	16,40 ^C ± 0,23	-
100	10,44 ^D ± 0,07	15,91 ^C ± 0,13	-
50	6,12 ^E ± 0,18	7,93 ^D ± 0,29	-
10	3,96 ^F ± 0,18	3,95 ^E ± 0,07	-

Concentração (mg.mL ⁻¹)	ABTS (% de inibição)	ABTS (μmol TE.L ⁻¹)
400	56,15 ^A ± 0,10	112,98 ^A ± 0,17
300	46,47 ^B ± 0,10	95,81 ^B ± 0,17
150	24,54 ^C ± 0,10	56,92 ^C ± 0,17
100	16,68 ^D ± 0,10	42,98 ^D ± 0,17
50	7,80 ^E ± 0,26	27,22 ^E ± 0,46
10	1,02 ^F ± 0,10	15,20 ^F ± 0,17

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). FONTE: A autora (2019).

De acordo com a literatura, a utilização de métodos distintos é fundamental para uma avaliação correta dos dados de atividade antioxidante, visto que nem sempre a correlação entre os métodos é alta (DUDONNÉ et al., 2009; SEERAM et al., 2008). Dois ou mais métodos devem ser levados em consideração para estabelecer as diferentes ações dos antioxidantes, pois cada método é dependente do princípio de detecção, sensibilidade, reatividade química, pH da reação, localização física, fonte de oxidantes e condições ambientais (ALVES et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; PRATT; BIRAC, 1979).

O método via radical ABTS é considerado simples e importante por atuar em várias faixas de pH. Pode ser utilizado em amostras hidrofílicas e lipofílicas devido a sua solubilidade em água e também em solventes orgânicos (MAGALHÃES et al., 2008). Apesar de se tratar de métodos *in vitro*, Wangcharoen e Morasuk, (2007) sugeriram que a técnica de determinação de atividade antioxidante via ABTS é mais expressiva para alimentos do que o método via radical DPPH.

O radical livre de DPPH é mais estável e comercializado já na forma de radical e não envolve condições extremas de temperatura, sendo estas vantagens do método sobre o método do radical ABTS. A velocidade da reação dos compostos com o DPPH é dependente e proporcional ao número de grupos hidroxilas disponíveis (AMMAR et al., 2009; BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Os resultados variam de acordo com a acessibilidade do radical DPPH. Moléculas de tamanho menor têm melhor acesso ao radical apresentam comumente maior atividade antioxidante. Moléculas grandes apresentam dificuldade de acesso ao radical e por isso reagem vagarosamente ou nem mesmo conseguem reagir utilizando essa técnica (MAGALHÃES et al., 2008). O resultado apresentado indica que a metodologia do radical ABTS consegue detectar de forma mais adequada a atividade do LBA.

Estudos mencionam a capacidade do LBA em inibir radicais hidroxilas livres bem como inibir as enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs - as quais podem atuar na progressão maligna do câncer) por meio de uma ligação com um átomo de zinco ou ferro divalente. Dessa forma ocorre a inibição da atividade, tornando o LBA um composto antioxidante e quelante (complexo quelante com íons de ferro na proporção de 1:1) (THART et al., 2002; BRIDEN, 2004; CHARLOUX et al., 1995; RUSCIANO et al., 2018; TASIC-KOSTOV et al., 2012; YU; VAN SCOTT, 2004).

De acordo com a literatura, testes foram realizados aplicando o LBA em um determinado grupo de alimentos, comprovando ação antioxidante devido à desaceleração de escurecimento quando comparado a uma amostra controle (NIELSEN, 2005). O estudo mencionado é baseado na variação de cores das cascas de banana e, portanto, não estabelece valores de capacidade antioxidante para comparação com o presente estudo. Resultados semelhantes foram estabelecidos para compostos de ação antioxidante conhecida, como a vitamina C e ácido cítrico (NJUS et al., 2020).

O ácido ascórbico, por apresentar ação antioxidante já estabelecida, é utilizado como amostra controle em grande parte dos estudos reportados em literatura. Em estudo realizado por De Souza et al., (2015) o valor estabelecido de DPPH para o ácido ascórbico protegido de luz é de 25 % na concentração de 0,11 mg.mL⁻¹ e de 4 % na concentração de 0,0176 mg.mL⁻¹. É possível notar que para atingir valores próximos de inibição do ácido ascórbico é necessário que a concentração aplicada de LBA seja aproximadamente 3000 vezes maior.

O LBA é declarado como composto antioxidante, porém, um único estudo quantitativo foi encontrado para esta propriedade (TASIC-KOSTOV et al., 2012). O estudo realizado por

Tasic-Kostov et al., (2012) estabelece uma ação antioxidante entre $41,0 \pm 2,23$ e $60,9 \pm 1,98$ % variando o composto entre 37 e 100 mg.mL⁻¹ de concentração. Comparado os dados obtidos pelo método de DPPH, os valores encontrados no presente estudo são consideravelmente menores aos valores estabelecidos por Tasic-Kostov et al., (2012). Porém, é possível notar que os valores de inibição dessa referência não são crescentes com o aumento da concentração do composto, havendo uma quebra nessa linearidade. O autor mencionado também não especifica o grau de pureza do composto utilizado.

De acordo com Escandar et al., (1994) o LBA forma complexos 1:1 com os íons férricos, prevenindo a formação de radicais hidroxil livres, mesmo que em baixas concentrações (4 mg.mL⁻¹). A lactoferrina é um composto quelante naturalmente presente nas lágrimas e devido a sua ação quelante é capaz de proteger o globo ocular (BELLAMY et al. 1992). A ausência de lubrificação pode causar o desenvolvimento de inflamações e doenças patógenas (RUSCIANO et al., 2018). No estudo desenvolvido por Rusciano et al., (2018) é feita uma comparação da ação da lactoferrina ao LBA, indicando uma ação quelante 112 vezes maior para o LBA.

Os resultados da TABELA 10 confirmam a capacidade quelante no LBA em diferentes concentrações para o íon ferro, e apenas para a partir de concentração 400 mg.mL⁻¹ quanto ao íon cálcio, o que pode ser explicado pela baixa sensibilidade do método titulométrico utilizado frente ao método espectrofotométrico. O resultado obtido para quelante de ferro, quando correlacionados com as porcentagens de inibição antioxidantes, obtiveram altas correlações de Pearson; (Quelante Ferro: ABTS obteve 0,972 e Quelante Ferro: DPPH obteve 0,954) o que corrobora com a hipótese de que a atividade antioxidante está altamente relacionada à capacidade quelante de metais.

Os resultados obtidos para a capacidade quelante de ferro no presente trabalho mostraram que o LBA consegue quelar menos íons ferro que o padrão EDTA em leitura UV-VIS. O EDTA na concentração de 0,05 mg.mL⁻¹ conseguiu quelar 55 % dos íons ferro, enquanto o LBA em 400 mg.mL⁻¹ atingiu 54 % de íons quelados. Poucos são os estudos em que se aplica o LBA com a função de quelante de íons (BALDWIN et al., 2010; ESCANDAR et al., 1994; SCHOLNICK; PFEFFER, 1980). Uma vez que a patente depositada por Baldwin et al. (2010) não menciona uma análise da fração de cálcio capaz de ser quelado em bebidas, assim como nenhum outro estudo menciona quantitativamente esses valores, a literatura atual apenas registra o potencial do LBA nesse campo de pesquisa, abrindo várias possibilidades para outras matrizes alimentares.

5.1.4 Atividade Antimicrobiana

O LBA foi capaz de inibir todos os micro-organismos testados (TABELA 11), apesar de apresentar menor atividade do que o controle cloranfenicol. As concentrações 400 e 300 mg.mL⁻¹ não diferem significativamente entre si. Soluções mais diluídas que 150 mg.mL⁻¹ não apresentaram inibição visível.

TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE LBA EM DIFERENTES PATÓGENOS

Concentração (mg.mL ⁻¹)	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>
	Halo de inibição (mm)				
Controle	40,0 ^{Ab} ± 1,3	42,2 ^{Aa} ± 0,9	38,9 ^{Abc} ± 1,2	36,9 ^{Ac} ± 0,2	37,9 ^{Abc} ± 0,4
400	10,7 ^{Ba} ± 2,8	9,6 ^{Bbc} ± 0,9	9,7 ^{Babc} ± 1,0	8,9 ^{Bc} ± 0,9	11,5 ^{Bab} ± 0,1
300	9,9 ^{Ba} ± 2,8	8,9 ^{BCab} ± 0,3	8,5 ^{BCa} ± 1,1	8,5 ^{BCb} ± 0,7	10,7 ^{Ba} ± 1,4
150	8,9 ^{Ba} ± 1,6	7,7 ^{Cb} ± 1,1	7,7 ^{Cb} ± 0,5	7,7 ^{Cb} ± 0,2	8,2 ^{Ca} ± 0,5

Controle = cloranfenicol 0,12 %. Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas e letras minúsculas diferentes representam diferença entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). FONTE: A autora (2019).

Alguns dos principais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana são os de cadeia fenólica e cíclica, com grupos hidroxila (-OH) que interagem com as membranas celulares dos micro-organismos, destruindo sua integridade (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). Os grupos ativos -OH conseguem deslocar elétrons, o que reduz o gradiente na membrana citoplasmáticas das células, levando à morte celular (ULTEE et al., 2002). Esses mesmos grupos também são capazes de ligar com sítios ativos de enzimas essenciais para o metabolismo bacteriano (FARAG et al., 1989). Mani-López, García e López-Malo, (2012) descrevem que os ácidos orgânicos se acumulam no citoplasma das células bacterianas até níveis tóxicos, interferindo e até mesmo interrompendo atividades vitais, pois a célula precisa iniciar um transporte ativo de prótons para manter a homeostase, sendo que o pH interno diminui.

Apesar de que grande parte dos trabalhos encontrados na literatura relata a aplicação de ácidos orgânicos em produtos cárneos, outros estudos exploram diferentes matrizes. Raybaudi-Massilia et al., (2009) comprovaram a eficácia do próprio ácido da fruta (maçãs recém cortadas), o ácido málico, como conservador, reduzindo em até 5 log CFU.g⁻¹ de *E. coli* e *Listeria*.

O ácido láctico (conhecido conservador cárneo), por exemplo, foi capaz de inibir *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e *S.aureus*, quando inoculados em carcaças de ovelhas segundo estudo de Dubal et al. (2004). Os autores também demonstraram que a combinação de outros ácidos (acético + propiônico) permite uma maior efetividade na mesma matriz. Além disso, a comprovada atividade antioxidante contribui na atividade antimicrobiana. A capacidade antioxidante inibe a geração de espécies reativas de oxigênio, e reduz o potencial redox do meio de cultura (CUEVA et al., 2010), o que por consequência interfere no crescimento das bactérias. É possível afirmar que as propriedades de ação antioxidante, quelante e antimicrobiana estão interligadas e com efeito potencial dos grupos hidroxilas. Se dentro de matrizes cosméticas uma propriedade consegue potencializar outra, levanta-se a hipótese aqui dos possíveis benefícios e efeitos semelhantes do LBA em matrizes alimentares.

Brul, (1999) também relaciona a atividade quelante de cálcio com a atividade antimicrobiana. Ele reporta que ácidos orgânicos, como o cítrico, são eficientes contra bactérias Gram positivas, pois as Gram negativas apresentam uma membrana externa e uma interna que dificultam o ataque. O resultado obtido no presente estudo corrobora com Brul, (1999), pois os maiores halos inibitórios foram estabelecidos frente a bactérias gram positivas.

No presente trabalho maiores inibições foram encontradas para as Gram positivas *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*. Isso pode ser explicado pelo fato de que essas bactérias não possuem membrana externa, apresentando natural menor resistência aos mecanismos preservativos, e sendo acessíveis principalmente a moléculas pequenas (BRUL, 1999), como as moléculas de ácidos orgânicos.

5.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO E TEMPERATURA DO PROCESSO DE COAGULAÇÃO

5.2.1 Umidade e pH

Para o requeijão, o valor de umidade estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Requeijão (BRASIL, 1997) deve ser inferior a 65 %, o teor de sólidos totais de no máximo 40 % e o teor de gordura em base seca superior a 55 %. No presente estudo é possível observar valores de umidade entre 56,56 e 65,20 % (TABELA 11). Para as amostras acidificadas com ácido láctico os valores não apresentam diferença estatística entre si. Para as amostras acidificadas com LBA uma única amostra diferiu estatisticamente das demais, sendo esta a formulação denominada H.

Estudos indicam que maiores teores de umidades aumentam também a proteólise primária da estrutura de modo a influenciar na capacidade de fusão e fluidez da massa (HICKEY et al., 2015; JOSHI et al., 2004). Em estudo realizado por (FERRÃO et al., 2018) em requeijão cremoso, o valor de umidade para a amostra controle foi de 64,67 %, sendo este valor intermediário aos valores estabelecidos no presente estudo.

O pH, assim como a umidade, exerce grande influência na organização das proteínas da massa base para os modelos de requeijão cremoso, com consequente interferência na reologia e durabilidade dos mesmos. A acidificação direta dos modelos com LBA 85 % comportou variação de pH entre 4,91 e 6,33 (TABELA 12). As amostras acidificadas com 2 % de ácido apresentaram pH estatisticamente iguais a amostra comercial. As amostras acidificadas com ácido láctico 85 % apresentaram uma maior redução dos valores de pH quando comparadas as amostras acidificadas com LBA. Quando comparadas à amostra comercial de requeijão cremoso, todas as amostras diferiram estatisticamente. A intensidade de acidificação e diminuição dos valores de pH está relacionado à respectiva capacidade de ionização dos ácidos aplicados. Observando os valores obtidos é comprovada uma maior capacidade de ionização do ácido láctico quando comparado ao LBA. O tempo e a temperatura de estufa não apresentaram grande influência em relação ao pH das amostras.

Em estudo realizado por Rinaldoni; Palatnik; Zaritzky; Campderró, (2014), queijos macios apresentaram pH médio de 5,77, sendo este valor próximo ao determinado no presente estudo para as amostras acidificadas com 2 % de LBA. Valor muito próximo a este (5,70) foi estabelecido para amostras de requeijão cremoso (OLIVEIRA et al., 2018), indicando a necessidade de comercialização sob refrigeração (<7 °C) por estar dentro da faixa de desenvolvimento de esporos bacterianos, ou seja, pH acima de 4,5 (DUQUE, 1991). Em estudo realizado por (FERRÃO et al., 2018) utilizando queijo processado, o valor médio de pH foi de 6,3, sendo este valor próximo às amostras acidificadas com 1 % de LBA.

TABELA 12 – UMIDADE E pH PARA MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO

LBA	Umidade (%)	pH	Ácido Lático	Umidade (%)	pH
A	62,15 ^A ± 1,03	6,20 ^A ± 0,03	A	65,20 ^A ± 1,03	4,96 ^E ± 0,02
B	62,18 ^A ± 3,24	6,20 ^A ± 0,01	B	64,87 ^A ± 3,24	4,88 ^F ± 0,02
C	63,49 ^A ± 1,09	6,30 ^A ± 0,13	C	64,15 ^A ± 1,09	5,12 ^C ± 0,01
D	62,88 ^A ± 1,02	6,33 ^A ± 0,15	D	61,72 ^A ± 1,02	5,15 ^C ± 0,01
E	60,31 ^A ± 7,79	6,21 ^A ± 0,01	E	59,55 ^A ± 2,79	5,08 ^D ± 0,02
F	61,04 ^A ± 0,76	6,17 ^A ± 0,01	F	62,33 ^A ± 0,76	5,28 ^B ± 0,01
G	61,22 ^A ± 2,18	5,66 ^{BC} ± 0,01	G	63,77 ^A ± 2,18	4,48 ^I ± 0,01
H	56,56 ^B ± 2,69	5,56 ^{BC} ± 0,14	H	61,11 ^A ± 2,69	4,41 ^J ± 0,01
I	60,03 ^A ± 1,27	5,64 ^{BC} ± 0,01	I	60,29 ^A ± 1,27	4,45 ^I ± 0,01
J	60,28 ^A ± 1,25	5,65 ^{BC} ± 0,01	J	60,53 ^A ± 1,25	4,51 ^H ± 0,01
K	61,11 ^A ± 2,47	5,63 ^{BC} ± 0,01	K	59,86 ^A ± 2,47	4,58 ^G ± 0,01
L	61,29 ^A ± 1,31	5,63 ^{BC} ± 0,00	L	58,94 ^A ± 1,31	4,52 ^H ± 0,01
M	63,00 ^A ± 2,07	5,56 ^{DE} ± 0,33	M	59,35 ^A ± 2,07	4,17 ^K ± 0,01
N	62,07 ^A ± 1,47	5,06 ^E ± 0,03	N	61,47 ^A ± 1,48	4,16 ^{KL} ± 0,02
O	61,71 ^A ± 0,85	4,92 ^{DE} ± 0,01	O	59,86 ^A ± 0,85	4,14 ^L ± 0,01
P	61,88 ^A ± 2,03	5,11 ^{CD} ± 0,01	P	59,70 ^A ± 2,03	4,13 ^L ± 0,02
Q	61,62 ^A ± 2,47	5,33 ^E ± 0,01	Q	60,60 ^A ± 2,48	4,16 ^{KL} ± 0,01
R	63,09 ^A ± 3,27	4,91 ^B ± 0,10	R	62,03 ^A ± 3,27	4,18 ^K ± 0,01
Req*	63,56 ^A ± 1,02	5,77 ^{BC} ± 0,01	Req*	63,56 ^A ± 1,02	5,77 ^A ± 0,01
P (K-S)**	0,52	<0,01	P (K-S)**	0,25	<0,01
P (ANOVA)	0,07	<0,01	P (ANOVA)	0,06	<0,01

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req- Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2019).

5.2.2 Aw

A aw apresentou variações entre 0,969 e 0,987 (TABELA 13). Estes valores são próximos ao valor estabelecido por Oliveira et al. (2018) em estudo sobre requeijão cremoso ($aw=0,970$). Em estudo realizado por Sołowiej et al. (2014) um análogo de queijo processado foi produzido com caseína ácida o qual apresentou variação de atividade de água entre 0,985 e 0,998. Queijos espalháveis apresentam elevada aw, desta forma, é fundamental o controle higiênico-sanitário

durante o seu processamento de modo a evitar o desenvolvimento de bactérias deteriorantes (MARRIOTT et al., 2018). Esse objetivo pode ser atingido por meio da adição de sólidos solúveis, como o NaCl (WEMMENHOVE et al., 2016). Não houve diferença estatística entre as amostras acidificadas com ácido láctico.

TABELA 13 – AW PARA MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁCTICO

LBA	aw	Ácido láctico	aw
A	0,987 ^A ± 0,002	A	0,971 ^{BC} ± 0,009
B	0,987 ^A ± 0,003	B	0,975 ^{BC} ± 0,005
C	0,984 ^{ABCD} ± 0,001	C	0,977 ^{BC} ± 0,001
D	0,986 ^{ABC} ± 0,002	D	0,978 ^B ± 0,002
E	0,987 ^A ± 0,001	E	0,976 ^{BC} ± 0,001
F	0,986 ^{ABC} ± 0,001	F	0,976 ^{BC} ± 0,002
G	0,976 ^{EF} ± 0,001	G	0,974 ^{BC} ± 0,001
H	0,976 ^{EF} ± 0,001	H	0,976 ^{BC} ± 0,001
I	0,978 ^{DEF} ± 0,002	I	0,975 ^{BC} ± 0,002
J	0,978 ^{DEF} ± 0,000	J	0,976 ^{BC} ± 0,001
K	0,978 ^{DEF} ± 0,001	K	0,976 ^{BC} ± 0,001
L	0,974 ^F ± 0,003	L	0,976 ^{BC} ± 0,002
M	0,977 ^{BCDEF} ± 0,003	M	0,970 ^{BC} ± 0,001
N	0,980 ^{DEF} ± 0,004	N	0,973 ^{BC} ± 0,002
O	0,979 ^{CDEF} ± 0,002	O	0,974 ^{BC} ± 0,001
P	0,979 ^{CDEF} ± 0,000	P	0,969 ^C ± 0,004
Q	0,979 ^{ABCDE} ± 0,001	Q	0,974 ^{BC} ± 0,003
R	0,981 ^{AB} ± 0,001	R	0,970 ^{BC} ± 0,001
Req*	0,977 ^{DEF} ± 0,001	Req*	0,977 ^A ± 0,001
P (K-S)**	<0,01	P (K-S)**	<0,01
P (ANOVA)	<0,01	P (ANOVA)	<0,01

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req- Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2020).

De acordo com uma nova classificação descrita por Trmcic et al., (2017), para avaliação da segurança de queijos (devido a uma larga diversidade de produtos) baseada na atividade de

água e pH, os modelos aqui produzidos se classificariam como A4 para as amostras acidificadas com 2 e 3 % de ácido láctico, B4 para as amostras acidificadas com 1 % de ácido láctico, C4 para as amostras acidificadas com 3 % de LBA, D4 para as amostras acidificadas com 2 % de LBA e amostra comercial e E5 para as amostras acidificadas com 1 % de LBA. É possível observar dentre os grupos que o único conjunto de amostras que se assemelha a amostra comercial é o conjunto acidificado com 2 % de LBA.

5.2.3 Medida instrumental de cor

A cor é um parâmetro dependente de fatores do processamento como as matérias-primas utilizadas, tempo, temperatura, pH, umidade e grau de dispersão da gordura (ZEHREN; NUSBAUM, 1992). As medidas instrumentais de cor estão descritas na TABELA 14. As amostras acidificadas com LBA apresentaram valores de saturação de cor (ângulo Hue) próximas entre si. Em estudo realizado por El-Sayed, Mohamed; Samah, Mohamed, Said; Salah, Ahmed, (2018), a amostra controle de queijo processado com baixo teor de gordura apresentou valores de ângulo Hue semelhantes as amostras de modelo de requeijão produzidas no presente estudo (sendo a maioria dos valores entre 82 e 87).

TABELA 14 –MEDIDA INSTRUMENTAL DE COR PARA MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO

LBA	C	°H	Ácido láctico	C	°H
A	14,74 ^{CD} ± 0,22	83,32 ^{GH} ± 0,37	A	14,35 ^A ± 0,09	86,49 ^F ± 0,27
B	15,46 ^B ± 0,14	82,77 ^H ± 0,17	B	11,60 ^E ± 0,16	88,57 ^{ABC} ± 0,23
C	15,40 ^{BC} ± 0,03	82,58 ^H ± 0,28	C	12,13 ^D ± 0,10	87,46 ^{DE} ± 0,13
D	13,74 ^E ± 0,11	84,13 ^{FG} ± 0,27	D	11,80 ^E ± 0,09	85,69 ^G ± 0,13
E	14,47 ^D ± 0,13	84,42 ^F ± 0,16	E	11,03 ^F ± 0,15	87,71 ^D ± 0,29
F	15,84 ^B ± 0,22	83,05 ^H ± 0,09	F	11,48 ^E ± 0,08	87,95 ^{BCD} ± 0,10
G	13,76 ^E ± 0,10	86,08 ^{DE} ± 0,43	G	11,05 ^F ± 0,10	-89,91 ^J ± 0,25
H	16,74 ^A ± 0,08	87,84 ^{AB} ± 0,06	H	10,48 ^G ± 0,01	-89,71 ^J ± 0,19
I	16,76 ^A ± 0,03	84,54 ^F ± 0,14	I	9,46 ^I ± 0,13	-89,72 ^J ± 0,04
J	15,83 ^B ± 0,08	84,59 ^F ± 0,18	J	10,52 ^G ± 0,08	88,76 ^A ± 0,31
K	15,79 ^B ± 0,18	86,85 ^{CD} ± 0,29	K	10,11 ^H ± 0,04	86,75 ^{EF} ± 0,77
L	12,93 ^F ± 0,11	86,20 ^{DE} ± 0,25	L	12,12 ^D ± 0,27	88,69 ^{AB} ± 0,43
M	11,64 ^{GH} ± 0,19	86,73 ^{CDE} ± 0,34	M	13,05 ^B ± 0,09	85,16 ^{GH} ± 0,13
N	12,34 ^{FG} ± 0,71	88,42 ^A ± 0,38	N	12,52 ^C ± 0,11	84,90 ^{HI} ± 0,06
O	12,09 ^G ± 0,55	87,34 ^{BC} ± 0,61	O	10,98 ^F ± 0,06	84,33 ^I ± 0,35
P	11,83 ^G ± 0,12	86,22 ^{DE} ± 0,28	P	10,99 ^F ± 0,10	84,61 ^{HI} ± 0,12
Q	11,10 ^H ± 0,17	85,89 ^E ± 0,55	Q	13,00 ^B ± 0,06	85,23 ^{GH} ± 0,11
R	12,04 ^G ± 0,21	86,89 ^{CD} ± 0,21	R	13,03 ^B ± 0,10	85,19 ^{GH} ± 0,11
Req*	14,31 ^{DE} ± 0,05	87,82 ^{AB} ± 0,14	Req*	14,31 ^A ± 0,05	87,82 ^{CD} ± 0,14
P (K-S)**	0,01	0,01	P (K-S)**	<0,01	0,12
P (ANOVA)	<0,01	<0,01	P (ANOVA)	<0,01	<0,01

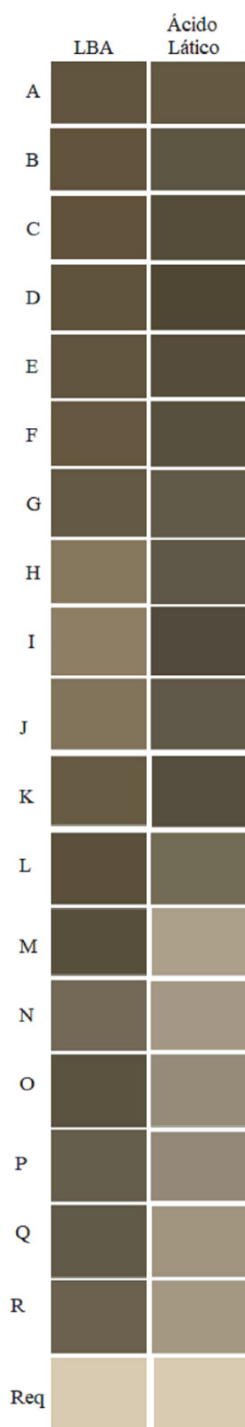
Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req- Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2021)

Para as amostras acidificadas com 1 e 2% de ambos os ácidos os valores de cor real, determinada por croma, foram semelhantes ao estabelecido no estudo de Lima et al., (2021) com valores entre 10,11 e 16,86. Valor semelhante foi obtido para queijos de ovelha no seu primeiro dia de armazenamento refrigerado (croma - 15,09) (TODARO et al., 2017).

A FIGURA 8 a seguir resume através da cor real das amostras, todos os valores numéricos anteriormente mostrados. Maior concentração de ácido (para a maioria das amostras) implica em maiores valores de luminosidade, fato este visível a partir da amostra M acidificada com 3 % de ambos os ácidos. Nenhuma das amostras produzidas se igualou estatisticamente, em

relação a todos os parâmetros, à amostra de requeijão comercial. As amostras mais distantes da amostra comercial foram as amostras acidificadas com 1 % de ambos os ácidos.

FIGURA 8 - COR INSTRUMENTAL DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADOS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO



FONTE: A autora (2021).

5.2.4 Sinérese

A utilização do LBA como composto acidificante permitiu a imobilização da água contida nas formulações devido a sua alta capacidade de adsorção, tornando a amostra visualmente mais viscosa. As amostras acidificadas com LBA apresentaram sinérese com valor máximo de 1,47 % (TABELA 15). Fato semelhante foi relatado para a proteína do soro em estudo realizado por Mleko; Foegeding, (2000), os quais sugeriram uma interação da mesma com a caseína de modo a aumentar a viscosidade e reduzir a sinérese.

Diversos são os fatores que podem interferir na sinérese, como por exemplo, tratamento térmico excessivo, rápida taxa de acidificação e/ou baixo teor de sólidos totais (LUCEY; SINGH, 1997). A variação entre tempo e temperatura de estufa durante o processamento não interferiu nos resultados obtidos para esse parâmetro. Para as amostras acidificadas com LBA a liberação de água (sinérese) foi inversamente proporcional à concentração de ácido aplicado para a maioria das amostras. Como consequência, a firmeza ou viscosidade do produto final aumentou com o aumento da sinérese (RODRIGUES et al., 2018).

A sinérese ocorre a partir de um rearranjo das partículas do sistema ou devido a um rompimento na estrutura do gel com separação e expulsão do soro (WALSTRA, 1993). Esta liberação de soro causada em produtos lácteos, para o consumidor, é considerado um defeito no produto final (AICHINGER et al., 2003; PANG et al., 2015). Desta forma, a estabilidade do produto, segurança microbiana, propriedades funcionais e reologia estão relacionadas diretamente com a sua capacidade de retenção de água (KNEIFEL et al., 1991).

As amostras acidificadas com ácido láctico nas concentrações de 2 e 3 % reduziram o pH de modo a liberar teores de água variando entre 34,58 e 44,29 %. Para as amostras acidificadas com ácido láctico (3 %) houve uma quebra estrutural devido à coagulação das proteínas (BADEM; UÇAR, 2016; GUINEE, 2017). Em trabalho executado por Silva et al., (2018) a sinérese de géis tratados com transglutaminase variou entre 18 % e 22 %, sendo este valor intermediário às amostras acidificadas com ácido láctico e LBA do presente estudo. As amostras acidificadas com ácido láctico apresentaram um aumento da sinérese proporcional ao teor de acidificante utilizado. As amostras de A-F (1 % de ácido láctico) apresentaram valores de sinérese semelhantes às amostras G-L (2 % de LBA).

TABELA 15 – SINÉRESE DAS FORMULAÇÕES DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADAS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO

LBA	Sinérese (%)	Ácido lático	Sinérese (%)
A	1,47 ^A ± 0,59	A	0,34 ^B ± 0,07
B	1,00 ^A ± 0,25	B	0,24 ^B ± 0,30
C	0,80 ^A ± 0,09	C	0,49 ^B ± 0,27
D	1,14 ^A ± 0,70	D	0,44 ^B ± 0,31
E	1,09 ^A ± 0,48	E	5,84 ^B ± 5,68
F	0,87 ^A ± 0,08	F	0,52 ^B ± 0,21
G	0,29 ^{AB} ± 0,07	G	44,39 ^A ± 9,25
H	0,40 ^{AB} ± 0,24	H	38,87 ^A ± 2,74
I	0,41 ^{AB} ± 0,22	I	41,50 ^A ± 3,08
J	0,29 ^{AB} ± 0,14	J	40,72 ^A ± 0,37
K	0,26 ^{AB} ± 0,01	K	40,18 ^A ± 2,68
L	0,36 ^{AB} ± 0,05	L	37,73 ^A ± 3,34
M	0,25 ^{AB} ± 0,06	M	34,58 ^A ± 1,56
N	0,19 ^B ± 0,07	N	41,10 ^A ± 0,34
O	0,18 ^{AB} ± 0,36	O	39,82 ^A ± 0,90
P	0,18 ^{AB} ± 0,02	P	39,61 ^A ± 1,09
Q	0,21 ^{AB} ± 0,05	Q	37,49 ^A ± 1,22
R	0,75 ^{AB} ± 0,08	R	38,83 ^A ± 2,85
Req*	0,31 ^{AB} ± 0,05	Req*	0,31 ^B ± 0,05
P (K-S)**	<0,01	P (K-S)**	<0,01
P (ANOVA)	<0,01	P (ANOVA)	<0,01

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req- Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2019).

De acordo com dados da literatura, a sinérese afeta significativamente a viscosidade das amostras (MUÑOZ et al., 2017) e a manutenção do soro é dependente da porosidade, visto que géis de poros maiores apresentam maior permeabilidade e geralmente são mais suscetíveis à sinérese (LUCHEY, 2001; LUCHEY et al., 1997). Lucey, (2017) relatou também que a redução de pH abaixo de 4,2 acarreta na formação de géis mais frágeis e suscetíveis à sinérese. Esse dado pode ser confirmado a partir das amostras acidificadas com ácido lático.

5.2.5 Reologia

Um aumento na taxa de cisalhamento (s^{-1}) resultou em uma redução da viscosidade para todas as amostras (comportamento pseudoplástico), resultado este que corrobora com Belsito et al. (2017) e Brighenti et al., (2018). O mesmo fato ocorreu para as amostras de gel de leite ácido analisadas por Silva et al. (2018), sendo o maior valor de 100 Pa.s com taxa de cisalhamento de 10^{-4} (s^{-1}) e o menor valor de 0,05 Pa.s com taxa de cisalhamento de $10^4 s^{-1}$ (SILVA et al., 2018).

A presença de minerais no modelo como o cálcio (Ca), auxilia na formação estrutural do produto final (LUCHEY et al., 2003). As propriedades reológicas são dependentes também do teor de umidade, concentração dos constituintes (proteína, gordura e sais), pH e condições de processamento (BUŇKA et al., 2018). No presente estudo a variabilidade da viscosidade está relacionada principalmente ao pH que foi alterado dependendo do agente acidificante utilizado e suas concentrações (1, 2 e 3 %). Os demais parâmetros de processamento foram constantes.

A viscosidade para as amostras acidificadas com ácido láctico foi reduzida com o aumento da concentração de ácido aplicado, e foram relativamente baixas (0,21–3,880 Pa.s) quando comparadas com as amostras acidificadas com LBA (0,99–9,41 Pa.s) (TABELA 16). A água atua como agente plasticizante, aumentando a mobilidade das proteínas e dessa forma contribui para a diminuição da firmeza e da elasticidade do produto final (DIMITRELI; THOMAREIS, 2004). Um aumento no teor de proteína acarreta em uma maior viscosidade, porém, este parâmetro não foi variável entre as amostras estudadas (DIMITRELI; THOMAREIS, 2004; SOŁOWIEJ et al., 2014).

TABELA 16 – REOLOGIA DAS FORMULAÇÕES DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO ACIDIFICADAS COM LBA OU ÁCIDO LÁTICO

LBA	Viscosidade Aparente (Pa s)	Ácido lático	Viscosidade Aparente (Pa s)
A	1,47 ^{GH} ± 0,09	A	3,88 ^B ± 0,31
B	1,15 ^H ± 0,04	B	1,53 ^C ± 0,12
C	1,35 ^{GH} ± 0,11	C	1,41 ^{CD} ± 0,08
D	1,61 ^{GH} ± 0,22	D	1,60 ^C ± 0,10
E	1,30 ^{GH} ± 0,09	E	1,09 ^D ± 0,08
F	0,99 ^H ± 0,09	F	0,62 ^E ± 0,05
G	2,47 ^{FGH} ± 0,13	G	0,46 ^{EF} ± 0,14
H	5,28 ^{CDE} ± 0,21	H	0,22 ^{EF} ± 0,00
I	2,35 ^{FGH} ± 0,38	I	0,55 ^E ± 0,17
J	4,52 ^{DEF} ± 0,27	J	0,59 ^E ± 0,20
K	2,38 ^{FGH} ± 0,11	K	0,57 ^{EF} ± 0,20
L	3,70 ^{EFG} ± 0,30	L	0,71 ^E ± 0,26
M	8,77 ^{AB} ± 0,87	M	0,21 ^{EF} ± 0,00
N	7,42 ^{ABC} ± 0,99	N	0,26 ^{EF} ± 0,03
O	8,94 ^{AB} ± 1,87	O	0,02 ^F ± 0,01
P	9,03 ^{AB} ± 0,85	P	0,38 ^{EF} ± 0,00
Q	9,41 ^A ± 1,07	Q	0,24 ^{EF} ± 0,04
R	6,25 ^{CD} ± 0,91	R	0,21 ^{EF} ± 0,01
Req*	6,79 ^{BCD} ± 1,95	Req*	6,79 ^A ± 1,95
P (K-S)**	0,02	P (K-S)**	<0,01
P (ANOVA)	<0,01	P (ANOVA)	<0,01

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req- Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2019).

As amostras “H” (2 % LBA) e “R” (3 % LBA) apresentaram valores próximos à amostra comercial de requeijão cremoso. A reduzida liberação de água para as formulações acidificadas com LBA influenciou diretamente em maiores valores de viscosidade em comparação as amostras acidificadas com ácido lático (FANG et al., 2019; GILBERT et al., 2020).

5.2.6 Capacidade Quelante para amostras selecionadas

A capacidade quelante de ferro está relacionada à diminuição da formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina em comparação a um controle (ausente de amostra, conforme TABELA 17). A ação quelante transforma os metais de transição em compostos estáveis de modo que ocorra a inibição das reações oxidativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). No presente estudo é possível observar que as amostras que permaneceram 30 min em estufa (tempo intermediário) apresentaram os menores valores para a capacidade quelante de ferro (H e K). As duas amostras que permaneceram 20 min em estufa (G e J), independentemente da temperatura (32 °C e 37 °C), apresentaram-se estatisticamente iguais à amostra comercial de requeijão (considera-se como amostra controle). Maiores tempos de estufa resultaram em valores intermediários de capacidade quelante de ferro, como mostrado na TABELA 17.

TABELA 17 – CAPACIDADE QUELANTE DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Amostras	Concentração (mg mL ⁻¹)	Quelante Ferro (%)
G	100	62,23 ^A ± 0,13
H	100	32,58 ^D ± 0,34
I	100	51,72 ^C ± 1,05
J	100	62,60 ^A ± 0,06
K	100	21,50 ^E ± 0,26
L	100	55,99 ^B ± 0,42
Req*	100	61,02 ^A ± 0,57
P (K-S)**		0,01
P (ANOVA)		<0,01

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req- Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2019).

Os resultados obtidos são considerados bons, pois atingem valores próximos (formulação G e J) a amostra controle comercial. Normalmente as amostras comerciais apresentam-se superiores aos parâmetros analisados justamente por apresentarem estabilizantes na sua composição. Portanto, o resultado obtido com as amostras acidificadas com LBA atingiu valores além do esperado.

Estudos comprovam uma relação dependente da concentração da amostra diluída utilizada para o resultado final da capacidade quelante, como é o caso do queijo cheddar produzido a partir de *Lactobacillus plantarum*, que exhibe aumento progressivo até atingir

23,68 % em concentração de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (WANG et al., 2018). No presente estudo é possível observar que não ocorreu um aumento proporcional dependente do tempo ou da temperatura de estufa, considerando que as amostras analisadas apresentavam a mesma concentração de LBA (2 %). Os melhores resultados foram obtidos para as amostras mantidas 20 minutos de estufa com valores estatisticamente iguais a amostra comercial analisada.

5.2.7 Capacidade Antioxidante para amostras selecionadas

A amostra comercial de requeijão (Nestle®) apresentou um menor grau de oxidação quando comparado às amostras do presente estudo. Este resultado pode ser justificado pelo teor de estabilizantes presentes nas amostras comerciais, como pirofosfato e polifosfato de sódio e conservador sorbato.

Para a análise frente ao radical ABTS não houve diferença significativa entre as amostras mantidas a 37°C (J, K e L) e a amostra mantida a 32°C (I) por 40 min (TABELA 16). A amostra comercial apresentou a maior porcentagem de inibição quando comparada às demais amostras, sendo a formulação mantida por 20 min a 32°C a amostra de valor mais próximo ao mesmo.

O método FRAP é considerado simples, rápido, barato e indicado para compostos hidrofílicos (RUFINO et al., 2010). Como desvantagem é possível citar resultados maiores que o real quando compostos de potencial redox inferior ao par Fe(III)/Fe(II) , possa na prática reduzir o Fe(III) a Fe(II) (MAGALHÃES et al., 2008). A capacidade antioxidante realizada pelo método de FRAP não demonstrou diferença significativa entre as amostras J e K, da mesma forma para as amostras L e I. É possível notar que as amostras apresentaram tendência semelhante em ambos os métodos, mas que a sensibilidade do método ABTS foi maior, atingindo valores de até 85 % de inibição. Pelo método de FRAP a maior porcentagem de inibição foi registrada para a amostra comercial de requeijão com valor de 46 %. É possível observar semelhança entre os valores do presente estudo e a literatura, conforme mostrado a seguir.

O estudo realizado por Kim et al. (2019) avaliou a ação antioxidante em queijos fortificados, apresentando como resultado capacidade antioxidante via ABTS de até $56,32 \pm 1,54$ %. Segundo o autor esse resultado foi obtido devido a compostos polifenólicos, como flavonoides (JUNG et al., 2016; RAMESH et al., 2012). Outros estudos também comprovam que a adição de subprodutos em queijos aumenta significativamente a capacidade

antioxidante (ABTS – máximo registrado de $4,00 \pm 0,06$ % e FRAP- máximo registrado de $26,45 \pm 0,25$ %) em comparação a uma amostra controle (respectivamente $0,96 \pm 0,08$ %; $1,52 \pm 0,05$ %) (LUCERA et al., 2018).

Outro ponto a ser observado é a influencia do tempo e da temperatura nos valores obtidos para a porcentagem de inibição de radicais oxidantes. As amostras submetidas à coagulação em estufa em maiores temperaturas e maior tempo apresentaram menores valores para a capacidade antioxidante.

A literatura menciona a complexidade do queijo e de suas diversas reações bioquímicas (RASHIDINEJAD et al., 2016). Os constituintes do queijo ou compostos incorporados à formulação podem ser afetados pelo tratamento térmico ou por reações químicas durante o processo de fusão da massa. De acordo com estudo realizado por Červenka et al. (2018) o flavonoide rutina apresentou degradação térmica devido à temperatura de fusão da massa (normalmente ao aumentar a temperatura o teor de rutina diminui). O mesmo ocorreu com as amostras acidificadas com LBA (TABELA 18) no presente estudo e também foi evidenciada em amostras de extrato de açafraão, conforme estudo realizado por Park et al., (2019). O autor menciona que a capacidade antioxidante dos extratos diminuiu após aquecimento a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ enquanto as amostras mantidas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ não sofreram queda na atividade antioxidante.

TABELA 18 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Amostras	Concentração (mg mL ⁻¹)	ABTS (% de inibição)	ABTS (μmol TE L ⁻¹)	FRAP (% de inibição)	FRAP (μmol sulfato ferroso/g)
G	100	71,52 ^B ± 0,17	144,09 ^B ± 0,21	27,03 ^B ± 0,18	8,49 × 10 ^{-3B}
H	100	57,51 ^D ± 0,12	114,85 ^D ± 0,21	14,13 ^E ± 0,18	1,07 × 10 ^{-3E}
I	100	68,09 ^C ± 0,52	139,24 ^C ± 0,86	22,15 ^C ± 0,18	8,33 × 10 ^{-4C}
J	100	68,83 ^C ± 0,26	140,15 ^C ± 0,43	17,38 ^D ± 1,33	7,16 × 10 ^{-4D}
K	100	68,46 ^C ± 0,26	138,94 ^C ± 0,43	18,80 ^D ± 0,63	4,82 × 10 ^{-4D}
L	100	68,74 ^C ± 0,13	139,85 ^C ± 0,21	21,65 ^C ± 0,30	7,09 × 10 ^{-4C}
Req*	100	85,16 ^A ± 0,08	164,24 ^A ± 0,21	46,44 ^A ± 0,18	3,84 × 10 ^{-6A}
P (K-S)**		0,01	0,01	0,01	0,01
P (ANOVA)		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Os valores são médias ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,10$). *Req - Requeijão cremoso comercial. **Teste de Normalidade (Kolmogorov-Smirnov). FONTE: A autora (2019).

A queda da atividade antioxidante pode ser relacionada a uma cinética de primeira ordem, onde, maiores valores de “k” são referentes a maiores temperaturas e por consequência uma diminuição mais acelerada da capacidade antioxidante (KIM et al., 2018). Tal fato também foi comprovado em estudo realizado por Patras et al., (2011) onde o ácido ascórbico e antocianinas presentes em geleia de morango foram degradados em uma taxa mais alta quando armazenados em temperatura mais elevadas (45 °C), seguindo uma reação de primeira ordem.

Fica claro que o sucesso do método é dependente da amostra em análise, assim como os tempos e temperaturas do processamento térmico influem diretamente na manutenção da capacidade antioxidante. Desta forma, a formulação “G”, mantida em estufa a 32 °C (menor temperatura) por 20 min (menor tempo) foi considerada a melhor dentre a 6 amostras escolhidas para análise após teste prévio.

5.3 USO COMBINADO DE ÁCIDOS PARA A PRODUÇÃO DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO

5.3.1 Umidade, pH, aw, cinzas e cloretos de modelos de requeijão cremoso

No presente estudo, é possível observar (TABELA 19) valores de umidade entre 60,17 e 62,69 %, não apresentando diferença estatística entre si ao longo dos dias de análise, para a maioria das amostras (exceto para a amostra III). Todas as amostras ficaram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para o parâmetro de umidade (<65 %) (BRASIL, 1997a). As amostras não apresentaram perda de umidade durante o período de armazenamento, sendo este um ponto positivo, pois para os consumidores, a perda de água pode ser considerada um defeito de fabricação. Utilizando proporções semelhantes de constituintes, Belsito et al., (2017) produziram um requeijão cremoso processado contendo 64,5 % de umidade, o que significa apenas 4 a 6 % menos água em comparação com as amostras-modelo produzidas.

A acidificação com a solução 85 % de ambos os ácidos tem uma variação de pH entre 4,01 (amostra I no dia 1) e 5,84 (amostra II no dia 22). A TABELA 19 mostra que as amostras acidificadas com ácido láctico apresentaram valores mais baixos de pH (amostras I e IV). Este fato está relacionado à capacidade de ionização ácida (pKa). O ácido láctico possui um valor mais alto de pKa quando comparado ao LBA, indicando maior facilidade de ionização e redução dos valores de pH (DUSSELIÉ et al., 2013; GUTIÉRREZ et al.,

2012a). Ao longo do armazenamento, houve uma tendência de as amostras aumentarem seu valor de pH, exceto a amostra III. Os valores mais altos de pH foram registrados para o modelo de requeijão cremoso acidificado com 100 % de LBA (amostra II) durante todo o período de armazenamento. A partir dos resultados obtidos, é possível observar que o LBA atuou efetivamente como agente acidificante na produção das amostras.

A Portaria nº 359 do Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997) não estabelece um padrão de pH para requeijão e, por esse motivo, os resultados obtidos foram comparados aos dados encontrados na literatura. Em um estudo realizado por Dal Castel et al. (2017), o requeijão cremoso processado sem lactose apresentou valor de pH entre 5,21-5,96, faixa esta que está próxima do valor encontrado para o modelo de requeijão cremoso acidificado exclusivamente com LBA (amostra II). Esses dados indicam que a quantidade de ácido empregado no modelo de requeijão cremoso desenvolvido está de acordo com este segmento de produtos. No entanto, é importante enfatizar a necessidade de altos padrões de higiene e armazenamento sob refrigeração ($<7^{\circ}\text{C}$), pois esse pH está dentro da faixa ideal de crescimento para bactérias formadoras de esporos (acima de pH 4,5).

O a_w apresentou variações entre 0,97 e 0,98. Esses valores são próximos aos relatados por Hirpara et al. (2016) para requeijão ($a_w = 0.972$). Devido ao alto teor de água e a_w , e às baixas quantidades de sal normalmente empregadas, o impacto na redução da atividade da água é quase insignificante. Exceto para a amostra II, as amostras apresentaram um aumento muito pequeno da a_w do dia 1 para o dia 8, permanecendo constante durante o período de armazenamento subsequente.

TABELA 19 – UMIDADE, PH, AW, CINZAS E CLORETOS DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Amostra	Umidade (%)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	61,92 ^{Aa} ± 0,11	61,88 ^{Aa} ± 0,33	61,81 ^{ABa} ± 0,19	61,40 ^{Aa} ± 1,52	62,68 ^{Aa} ± 2,14
Dia 8	62,29 ^{Aa} ± 0,65	61,93 ^{Aa} ± 0,68	62,69 ^{Aa} ± 0,59	61,47 ^{Aa} ± 0,26	61,77 ^{Aa} ± 0,66
Dia 15	60,5 ^{Aac} ± 0,03	61,30 ^{Aab} ± 0,62	61,38 ^{Ba} ± 0,06	61,15 ^{Aab} ± 0,19	60,17 ^{Ac} ± 0,41
Dia 22	61,31 ^{Aa} ± 2,92	60,82 ^{Aa} ± 0,27	61,96 ^{ABa} ± 0,77	61,09 ^{Aa} ± 2,60	60,58 ^{Aa} ± 0,83

Amostra	pH				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	4,01 ^{Bc} ± 0,16	5,34 ^{Ca} ± 0,04	5,11 ^{Ab} ± 0,02	4,47 ^{Bd} ± 0,01	4,33 ^{Dc} ± 0,03
Dia 8	4,58 ^{Ac} ± 0,01	5,48 ^{Ba} ± 0,01	4,94 ^{Cb} ± 0,01	4,79 ^{Ac} ± 0,04	4,94 ^{Cb} ± 0,05
Dia 15	4,58 ^{Ac} ± 0,01	5,83 ^{Aa} ± 0,01	5,14 ^{Ac} ± 0,02	4,80 ^{Ad} ± 0,01	5,37 ^{Bb} ± 0,01
Dia 22	4,61 ^{Ac} ± 0,01	5,84 ^{Aa} ± 0,01	5,07 ^{Bc} ± 0,01	4,78 ^{Ad} ± 0,01	5,46 ^{Ab} ± 0,01

Amostra	aw				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,97 ^{Bb} ± 0,00	0,97 ^{Cab} ± 0,00	0,97 ^{Bab} ± 0,00	0,97 ^{Bab} ± 0,00	0,97 ^{Ba} ± 0,00
Dia 8	0,98 ^{Ab} ± 0,00	0,98 ^{ABab} ± 0,00	0,98 ^{Aa} ± 0,00	0,98 ^{Ab} ± 0,00	0,98 ^{ABab} ± 0,00
Dia 15	0,98 ^{Aa} ± 0,00	0,98 ^{Aa} ± 0,00	0,98 ^{Aa} ± 0,00	0,98 ^{Aa} ± 0,01	0,98 ^{Aa} ± 0,00
Dia 22	0,97 ^{Aa} ± 0,00	0,98 ^{BCa} ± 0,00	0,97 ^{Ba} ± 0,00	0,98 ^{ABa} ± 0,00	0,98 ^{Aa} ± 0,00

Amostra	Cinzas (%)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	2,88 ^{Ba} ± 0,15	2,89 ^{ABa} ± 0,04	2,87 ^{Aa} ± 0,11	2,88 ^{Aa} ± 0,05	2,75 ^{Aa} ± 0,31
Dia 8	2,69 ^{Bab} ± 0,07	3,06 ^{Aa} ± 0,12	2,98 ^{Aab} ± 0,37	2,62 ^{Bb} ± 0,08	2,71 ^{Aab} ± 0,06
Dia 15	2,83 ^{Ba} ± 0,04	2,80 ^{Ba} ± 0,19	2,86 ^{Aa} ± 0,08	2,84 ^{Aa} ± 0,08	2,83 ^{Aa} ± 0,09
Dia 22	3,11 ^{Aa} ± 0,15	2,96 ^{Aab} ± 0,02	2,89 ^{Ab} ± 0,16	2,90 ^{Ab} ± 0,01	2,87 ^{Ab} ± 0,05

Amostra	Cloretos (%)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,95 ^{Aab} ± 0,04	1,17 ^{Aa} ± 0,14	1,08 ^{Aab} ± 0,01	0,90 ^{Ab} ± 0,17	1,15 ^{Aa} ± 0,05
Dia 8	0,91 ^{Abc} ± 0,08	1,07 ^{Aa} ± 0,02	0,89 ^{Bc} ± 0,01	1,05 ^{Aab} ± 0,10	0,75 ^{Bc} ± 0,09
Dia 15	1,03 ^{Aab} ± 0,14	1,04 ^{Aab} ± 0,12	0,88 ^{Bb} ± 0,04	0,96 ^{Aab} ± 0,08	1,13 ^{Aa} ± 0,12
Dia 22	1,11 ^{Aa} ± 0,27	1,04 ^{Aa} ± 0,11	1,09 ^{Aa} ± 0,06	1,01 ^{Aa} ± 0,11	1,06 ^{Aa} ± 0,10

Média ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.10$). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

Para as cinzas verificou-se que não houve diferença significativa entre as amostras, para a maioria dos dias analisados. As amostras acidificadas com um único ácido apresentaram um ligeiro aumento entre o primeiro e o último dia de armazenamento (I e II). As demais amostras mantiveram o teor de cinzas igual estatisticamente durante todo o período. O teor de cinzas manteve-se entre 2,62 e 3,11 %. Os valores do presente estudo são condizentes com valores encontrados na literatura para amostras de requeijão cremoso, como é o caso do estudo realizado por Bittencourt et al. (2013). Os autores relatam um teor de cinzas de 2,47 % para requeijão marajoara.

Durante o período de armazenamento das amostras (22 dias), não foi observado diferença significativa na fração de cloretos, ou seja, com a maturação das amostras não ocorreu a degradação dos sais presentes. Da mesma forma, comparando as 5 amostras ao fim dos 22 dias, as amostras não apresentaram diferença significativa entre si. O valor máximo registrado, decorrente da adição da salmoura (1,15 %) é próximo ao estabelecido em literatura (1,3-1,8 %) (DUGAT-BONY et al., 2016; NUNES et al., 2018). A quantificação do sal torna-se importante devido a sua influência direta no sabor, aroma, textura e segurança dos queijos (GUINEE et al., 2004).

5.3.2 Acidez e medida instrumental de cor

A porcentagem de agente acidificante incorporado às amostras foi a mesma e em igual concentração (85 %), a diferença nos valores encontrados para acidez está relacionada ao ácido aplicado, visto que a molaridade do ácido láctico é cerca de quatro vezes menor do que a molaridade do LBA. Esse fato indica que em iguais proporções mássicas haverá uma maior quantidade de moléculas de ácido láctico quando comparado ao LBA. Consequência disso será também variação dos seus valores de pKa.

As amostras de modelo de requeijão cremoso cuja acidificação foi realizada com prevalência ou exclusividade do ácido láctico (pKa – 3,86) apresentaram maiores valores de acidez, como é o caso da amostra I (100 % ácido láctico) e da amostra IV (75 % ácido láctico). A amostra de maior proporção de ácido láctico (I) apresentou uma queda da acidez no decorrer do tempo de armazenamento. As demais amostras estatisticamente não diferiram seu valor final do inicial para este parâmetro. As amostras apresentaram diferença significativa entre si para a maioria dos dias analisados. Os valores estão expressos de forma detalhada na TABELA 20.

TABELA 20 – ACIDEZ E MEDIDA INSTRUMENTAL DE COR DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Amostra	Acidez				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,61 ^{Aa} ± 0,04	0,10 ^{Bd} ± 0,01	0,26 ^{Bc} ± 0,02	0,43 ^{Ab} ± 0,01	0,27 ^{Ac} ± 0,13
Dia 8	0,58 ^{ABa} ± 0,02	0,16 ^{Ad} ± 0,03	0,40 ^{Ab} ± 0,03	0,43 ^{Ab} ± 0,01	0,25 ^{Ac} ± 0,02
Dia 15	0,55 ^{Ba} ± 0,03	0,14 ^{ABd} ± 0,02	0,32 ^{Bbc} ± 0,04	0,37 ^{Ab} ± 0,07	0,24 ^{Ac} ± 0,03
Dia 22	0,57 ^{ABa} ± 0,02	0,12 ^{ABc} ± 0,03	0,29 ^{Bb} ± 0,04	0,34 ^{Ab} ± 0,05	0,15 ^{Ac} ± 0,02
Amostra	L				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	49,18 ^{Ac} ± 2,54	66,93 ^{Aa} ± 3,41	51,87 ^{Ac} ± 1,47	50,51 ^{Ac} ± 1,46	58,92 ^{Ab} ± 0,55
Dia 8	44,89 ^{Ba} ± 0,45	45,44 ^{Ba} ± 0,65	45,82 ^{Ba} ± 0,88	46,02 ^{BCa} ± 1,19	46,44 ^{Ca} ± 0,73
Dia 15	47,66 ^{ABab} ± 0,34	46,35 ^{Bab} ± 1,02	47,74 ^{ABa} ± 2,53	43,98 ^{Cb} ± 1,55	44,75 ^{Cab} ± 1,78
Dia 22	47,32 ^{ABa} ± 0,75	48,62 ^{Ba} ± 2,33	47,67 ^{ABa} ± 3,86	48,66 ^{ABa} ± 0,12	49,46 ^{Ba} ± 1,09
Amostra	a*				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,87 ^{ABb} ± 0,13	1,30 ^{Aa} ± 0,03	0,87 ^{Ab} ± 0,02	0,77 ^{ABb} ± 0,05	1,17 ^{Aa} ± 0,04
Dia 8	0,51 ^{Cb} ± 0,04	0,85 ^{Ca} ± 0,04	0,33 ^{Cc} ± 0,05	0,49 ^{Cb} ± 0,09	0,72 ^{Ca} ± 0,04
Dia 15	0,72 ^{Bb} ± 0,01	0,63 ^{Db} ± 0,09	0,72 ^{Bb} ± 0,06	0,62 ^{BCb} ± 0,09	0,89 ^{Ba} ± 0,01
Dia 22	0,89 ^{Abc} ± 0,02	1,02 ^{Bb} ± 0,04	0,86 ^{ABc} ± 0,01	0,79 ^{Ac} ± 0,07	1,12 ^{Aa} ± 0,18
Amostra	b*				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	8,30 ^{Bc} ± 0,19	14,13 ^{Aa} ± 0,48	10,02 ^{Ac} ± 0,22	9,29 ^{Bd} ± 0,24	13,07 ^{Ab} ± 0,08
Dia 8	8,69 ^{Ad} ± 0,11	11,14 ^{Bb} ± 0,13	9,65 ^{ABc} ± 0,11	9,42 ^{ABc} ± 0,08	11,48 ^{Ba} ± 0,19
Dia 15	8,64 ^{Ac} ± 0,05	9,52 ^{Cb} ± 0,21	9,53 ^{Bb} ± 0,33	9,23 ^{Bbc} ± 0,24	10,97 ^{Ba} ± 0,39
Dia 22	8,84 ^{Ac} ± 0,11	11,29 ^{Ba} ± 0,41	10,00 ^{ABb} ± 0,13	9,72 ^{Ab} ± 0,05	11,35 ^{Ba} ± 0,16
Amostra	°H				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	84,01 ^{Cb} ± 0,99	84,74 ^{Ba} ± 0,07	85,04 ^{Cab} ± 0,01	85,24 ^{BCab} ± 0,34	84,90 ^{Bab} ± 0,19
Dia 8	86,66 ^{Ab} ± 0,29	85,65 ^{Ac} ± 0,24	88,04 ^{Aa} ± 0,28	87,04 ^{Ab} ± 0,58	86,40 ^{Abc} ± 0,21
Dia 15	85,26 ^{Bb} ± 0,13	86,20 ^{Aa} ± 0,52	85,66 ^{Bab} ± 0,25	86,15 ^{ABa} ± 0,59	85,38 ^{Bab} ± 0,18
Dia 22	84,23 ^{BCbc} ± 0,22	84,83 ^{Bac} ± 0,37	85,37 ^{BCa} ± 0,40	85,06 ^{Ca} ± 0,26	83,94 ^{Cb} ± 0,37
Amostra	Croma				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	8,35 ^{Bc} ± 0,18	14,19 ^{Aa} ± 0,48	10,05 ^{Ac} ± 0,22	9,32 ^{Bd} ± 0,24	13,12 ^{Ab} ± 0,08
Dia 8	8,70 ^{Ad} ± 0,11	11,17 ^{Bb} ± 0,13	9,66 ^{ABc} ± 0,11	9,43 ^{ABc} ± 0,07	11,51 ^{Ba} ± 0,19
Dia 15	8,67 ^{Ac} ± 0,05	9,54 ^{Cb} ± 0,21	9,56 ^{Bb} ± 0,34	9,25 ^{Bbc} ± 0,24	11,00 ^{Ba} ± 0,39
Dia 22	8,88 ^{Ac} ± 0,10	11,34 ^{Ba} ± 0,40	10,03 ^{ABb} ± 0,14	9,75 ^{Ab} ± 0,05	11,42 ^{Ba} ± 0,16

Média ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.10$). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

Estudo realizado por Elkot e Khalil (2018) em queijo cremoso mostrou acidez entre 0,55 e 0,69 %, sendo estes valores próximos à formulação “I” do presente estudo. Já em amostra de queijo cremoso produzido a partir de leite de cabra a acidez registrada foi mais próxima (0,28 % - amostra controle) à das amostras acidificadas com LBA (EL-SHAFEI et al., 2017).

Todas as amostras apresentaram cor amarelada, como indicado pelos resultados positivos do parâmetro b^* , variando de 8,30 a 14,13. Destes, os valores das amostras II e V são consistentes com os encontrados para o requeijão cremoso processado e adicionado de biomassa de banana verde (11,77-13,31) (PIVETTA et al., 2019). Este resultado é justificado pela presença de LBA, que intensifica tal coloração.

Os valores mais baixos de a^* (TABELA 20) foram predominantes para amostras acidificadas com a maior quantidade de ácido láctico (amostras I e IV). Estes resultados indicam uma ligeira tendência de coloração verde. A luminosidade (L) foi reduzida em todos os tratamentos, comparando o primeiro e o último dia de armazenamento, onde foi evidenciado um valor inicial mais alto para a amostra II, acidificada exclusivamente com LBA. Ao final do período de armazenamento, as amostras não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento aplicado.

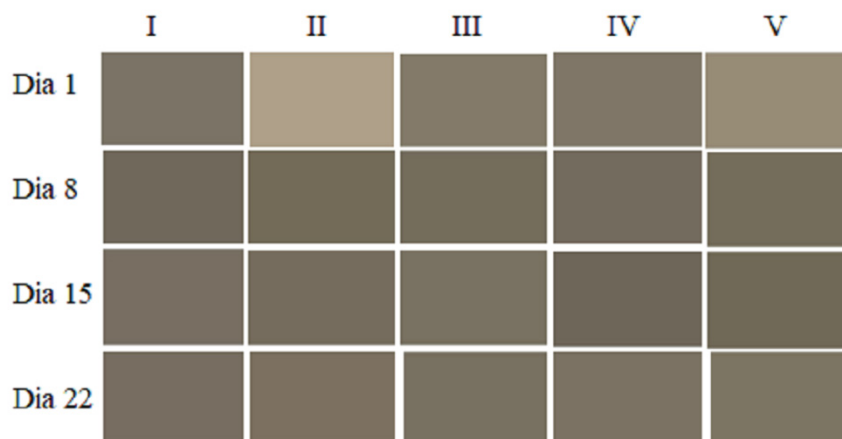
Maiores quantidades de LBA na formulação também representam valores mais altos para os parâmetros b^* e a^* . Dados os resultados apresentados, o LBA apresenta diferenças práticas iguais ou pequenas àqueles de alguns dos ácidos orgânicos normalmente aplicados em queijos cremosos - como ácido láctico - em relação à umidade, pH, a_w e medida instrumental de cor.

A cor real dos modelos de requeijão, expressa pelo ângulo Hue, apresentaram diferenças significativas entre os dias 1 e 22 para a maioria das amostras (I, III, IV e V). Entre si, todas as amostras diferiram estatisticamente.

A intensidade de cor registrada pelo croma apresentou variações entre as amostras e variações ao longo dos dias de armazenamento. As amostras acidificadas com LBA apresentaram uma maior intensidade na sua cor se comparadas as demais amostras e esse fato foi registrado até o fim do período de armazenamento.

Por meio da FIGURA 9 nota-se uma variação da cor das amostras ao longo dos 22 dias de armazenamento. A perda gradual da luminosidade ocorreu para todas as amostras interferindo de forma direta na coloração final. As formulações acidificadas com uma maior porcentagem de LBA (II e V) apresentaram coloração mais clara e luminosa no primeiro dia de armazenamento. Ao fim dos 22 dias todas as amostras apresentaram coloração semelhante, independente da mistura de ácido aplicada.

FIGURA 9- VARIAÇÃO DE COR DAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO AO LONGO DOS 22 DIAS DE ARMAZENAMENTO



Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA.

FONTE: A autora (2021).

5.3.3 Reologia

A viscosidade (η) do modelo de requeijão cremoso avaliada neste trabalho é apresentada na TABELA 21. Como esperado, os aumentos de temperatura reduziram a viscosidade do modelo (para casos específicos, nenhuma alteração significativa foi observada). Valores mais baixos de viscosidade também foram verificados à medida que o tempo de armazenamento do modelo aumentou (a temperaturas fixas de análise). As amostras cuja viscosidade se aproximaram mais do requeijão cremoso comercial foram as formulações II e V.

Os modelos de Ostwald-de-Waele (demonstrado na TABELA 22) e Herschel-Bulkley apresentaram $n < 1$, o que significa que o modelo de requeijão cremoso não é um fluido newtoniano, mas pseudoplástico. Isso está de acordo com a literatura para queijos macios ou cremosos (DIMITRELI; THOMAREIS, 2004; FOSBERG; JOYNER, 2018). Para requeijão cremoso, especificamente, existem trabalhos que obtiveram o mesmo resultado (FERRÃO et al., 2018).

TABELA 21 – VISCOSIDADE DO MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO (η mPa•s) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE ESTOCAGEM REFRIGERADO (2.2 °C)

T (°C)	10	20	30
Amostra I			
Dia 1	286,0 ^{Aa} ± 0,1	258,6 ^{ABa} ± 0,2	256,2 ^{Aa} ± 0,0
Dia 8	290,3 ^{Aa} ± 0,0	278,9 ^{Aa} ± 0,2	216,9 ^{Aa} ± 0,2
Dia 15	256,2 ^{Ba} ± 0,0	222,2 ^{ABab} ± 0,2	202,3 ^{Bb} ± 0,3
Dia 22	216,9 ^{Ca} ± 0,1	180,6 ^{Ba} ± 0,2	178,4 ^{Ba} ± 0,1
T (°C)	10	20	30
Amostra II			
Dia 1	27581,5 ^{Aa} ± 0,9	14382,3 ^{Ab} ± 1,4	4382,3 ^{Ac} ± 1,4
Dia 8	5191,8 ^{Ba} ± 0,4	3185,6 ^{Bb} ± 0,9	2882,1 ^{Bb} ± 0,0
Dia 15	3736,0 ^{Ca} ± 0,8	2751,7 ^{Bb} ± 1,0	2517,2 ^{Cb} ± 0,1
Dia 22	3269,2 ^{Ca} ± 0,9	2743,2 ^{Bb} ± 0,4	1931,9 ^{Dc} ± 0,9
T (°C)	10	20	30
Amostra III			
Dia 1	1945,9 ^{Aa} ± 0,5	1879,8 ^{Aab} ± 0,0	1836,5 ^{Ab} ± 0,1
Dia 8	972,4 ^{Ba} ± 0,0	961,8 ^{Ba} ± 0,1	721,8 ^{Bb} ± 0,2
Dia 15	972,4 ^{Ba} ± 0,0	713,2 ^{Cb} ± 0,4	712,8 ^{Bb} ± 0,1
Dia 22	972,4 ^{Ba} ± 0,0	637,4 ^{Cb} ± 0,6	641,3 ^{Bb} ± 0,3
T (°C)	10	20	30
Amostra IV			
Dia 1	1945,9 ^{Aa} ± 0,5	838,2 ^{Ab} ± 0,1	729,2 ^{Ac} ± 0,0
Dia 8	972,4 ^{Ba} ± 0,0	658,6 ^{Bb} ± 0,5	600,5 ^{Bb} ± 0,3
Dia 15	256,2 ^{Ca} ± 0,0	234,5 ^{Cb} ± 0,1	216,9 ^{Cc} ± 0,0
Dia 22	256,2 ^{Ca} ± 0,0	212,3 ^{Cb} ± 0,2	206,2 ^{Cb} ± 0,2
T (°C)	10	20	30
Amostra V			
Dia 1	48962,0 ^{Aa} ± 0,5	4590,8 ^{Ab} ± 0,8	4254,0 ^{Ab} ± 0,5
Dia 8	3730,4 ^{Ba} ± 0,3	3347,7 ^{Bb} ± 0,0	3275,8 ^{Bb} ± 0,3
Dia 15	3569,1 ^{Ca} ± 0,4	2484,0 ^{Cb} ± 0,2	1321,2 ^{Cb} ± 0,4
Dia 22	2101,3 ^{Da} ± 0,2	1364,4 ^{Db} ± 0,0	1352,4 ^{Cb} ± 0,3

Média ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.10$). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

TABELA 22 – ÍNDICE DE CONSISTÊNCIA n PELO MODELO DE OSTWAL-DE -WAELE

T (°C)	10	20	30
Amostra I			
Dia 1	0,368 ^{Bb} ± 0,087	0,395 ^{Ba} ± 0,023	0,411 ^{Ac} ± 0,027
Dia 8	0,400 ^{Ba} ± 0,072	0,414 ^{Ba} ± 0,033	0,152 ^{Cb} ± 0,017
Dia 15	0,626 ^{Aa} ± 0,074	0,579 ^{Ab} ± 0,045	0,226 ^{Bc} ± 0,032
Dia 22	0,171 ^{Ca} ± 0,026	0,175 ^{Ca} ± 0,013	0,184 ^{BCa} ± 0,022
T (°C)	10	20	30
Amostra II			
Dia 1	0,442 ^{Ca} ± 0,03	0,223 ^{Cb} ± 0,021	0,254 ^{Db} ± 0,011
Dia 8	0,470 ^{Cb} ± 0,045	0,560 ^{Aa} ± 0,043	0,591 ^{Aa} ± 0,038
Dia 15	0,654 ^{Aa} ± 0,023	0,393 ^{Bc} ± 0,029	0,522 ^{Bb} ± 0,048
Dia 22	0,511 ^{Ba} ± 0,038	0,401 ^{Bb} ± 0,042	0,341 ^{Cc} ± 0,014
T (°C)	10	20	30
Amostra III			
Dia 1	0,798 ^{Ab} ± 0,049	0,817 ^{Aa} ± 0,053	0,848 ^{Aa} ± 0,063
Dia 8	0,066 ^{Bb} ± 0,02	0,204 ^{Ba} ± 0,017	0,017 ^{Db} ± 0,001
Dia 15	0,071 ^{Bc} ± 0,007	0,168 ^{Ca} ± 0,013	0,118 ^{Cb} ± 0,032
Dia 22	0,081 ^{Bb} ± 0,009	0,228 ^{Ba} ± 0,019	0,194 ^{Ba} ± 0,012
T (°C)	10	20	30
Amostra IV			
Dia 1	0,798 ^{Aa} ± 0,052	0,795 ^{Aa} ± 0,062	0,837 ^{Ab} ± 0,073
Dia 8	0,664 ^{Ba} ± 0,036	0,617 ^{Bb} ± 0,042	0,604 ^{Bb} ± 0,038
Dia 15	0,425 ^{Ca} ± 0,028	0,425 ^{Ca} ± 0,028	0,206 ^{Db} ± 0,032
Dia 22	0,294 ^{Da} ± 0,031	0,223 ^{Db} ± 0,015	0,272 ^{Cab} ± 0,016
T (°C)	10	20	30
Amostra V			
Dia 1	0,858 ^{Aa} ± 0,049	0,842 ^{Aa} ± 0,071	0,554 ^{Cb} ± 0,062
Dia 8	0,608 ^{Db} ± 0,042	0,630 ^{Ca} ± 0,051	0,613 ^{Cb} ± 0,068
Dia 15	0,701 ^{Cb} ± 0,051	0,632 ^{Cc} ± 0,048	0,761 ^{Ba} ± 0,055
Dia 22	0,799 ^{Bb} ± 0,044	0,723 ^{Bc} ± 0,054	0,868 ^{Aa} ± 0,056

Média ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.10$). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

5.3.4 Textura

Juntamente com a proteólise é possível mencionar que o teor de cálcio influi na maturação dos queijos e seus modelos, causando alterações de textura e propriedades de escoamento (LUCEY; FOX, 1993; LUCEY et al., 2003; SHEEHAN; GUINEE, 2004 ; WATKINSON et al., 2001). A maturação modifica o produto quanto a características de sabor e aroma específicos devido as reações bioquímicas, físico-químicas e microbiológicas (FOX et al., 1990; LUCEY et al., 2003).

As amostras não apresentaram diferenças significativas para o parâmetro dureza no decorrer dos 22 dias, com exceção da amostra V (TABELA 23). É comum um aumento na dureza ao longo do período de armazenamento devido principalmente a perda de umidade do produto. Idealizando o sistema, a dureza deve se manter constante desde a produção até o consumo do produto final. Esse fato ocorreu para as amostras I, II, III e IV. As amostras apresentaram diferenças significativas entre si em cada dia de análise. Isso ocorre devido a formação estrutural de cada amostra referente, principalmente, ao agente acidificante utilizado. Dessa forma, cada amostra requer uma força diferente para que ocorra uma deformação na sua estrutura. As amostras cujo pH se aproximavam de 5 apresentaram uma base estrutural mais firme, comprovado na análise de textura com um valor numérico de dureza maior quando comparado as demais amostras. Esse fato também é observado e avaliado no estudo realizado por Brickley et al. (2008).

Uma variação da elasticidade entre o dia 1 e o dia 22 ocorreu apenas para as amostras III e V (em ambos os casos ocorreu um aumento do valor com o passar dos dias) com diferença significativa. Essa variação da elasticidade faz com que as amostras se tornem quebradiças no decorrer do tempo de armazenamento. O primeiro dia de análise foi o único onde as amostras não apresentaram diferença significativa entre si. No decorrer do tempo de armazenamento as amostras foram adquirindo propriedades elásticas próprias o que permitiu que nos dias 8, 15 e 22 as amostras apresentassem elasticidades diferentes entre si (TABELA 23).

O parâmetro coesividade demonstrou um aumento numérico apenas para a amostra III relacionando o primeiro e o ultimo dia de armazenamento (dias 1 e 22). As demais amostras não apresentaram diferença significativa ao longo do período estudado ($p > 0,10$). Ao comparar as amostras entre si é possível observar na TABELA 23 que não há diferença significativa para a coesividade apenas no primeiro dia de análise. Nos demais dias de

armazenamento as amostras apresentaram diferentes extensões até a sua ruptura indicando uma diferença significativa entre si para este parâmetro. Na prática sensorial trata-se da força aplicada pelos dentes para que ocorra a ruptura do alimento (SZCZESNIAK, 2002).

TABELA 23 – ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA (TPA)

Amostra	Dureza (N)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	1,57 ^{Aa} ± 0,34	4,99 ^{Aa} ± 1,79	4,77 ^{Aab} ± 0,64	4,43 ^{Aab} ± 0,81	2,27 ^{Bbc} ± 0,64
Dia 8	2,93 ^{Ab} ± 1,21	5,60 ^{Aab} ± 0,42	7,37 ^{Aa} ± 0,16	4,63 ^{Aab} ± 1,06	6,81 ^{ABab} ± 3,03
Dia 15	3,19 ^{Aa} ± 1,44	5,67 ^{Aa} ± 0,38	7,92 ^{Aa} ± 2,84	5,56 ^{Aa} ± 0,20	8,11 ^{Aab} ± 2,57
Dia 22	3,48 ^{Ab} ± 0,33	8,02 ^{Aab} ± 1,59	8,05 ^{Aab} ± 0,25	5,73 ^{Aab} ± 0,43	10,33 ^{Aa} ± 3,63
Amostra	Elasticidade (mm)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,18 ^{Aa} ± 0,09	0,85 ^{Aa} ± 0,51	0,46 ^{Ba} ± 0,16	1,07 ^{Aa} ± 0,56	0,33 ^{Ba} ± 0,07
Dia 8	0,26 ^{Ab} ± 0,11	0,89 ^{Aab} ± 0,06	0,93 ^{ABab} ± 0,10	2,40 ^{Aa} ± 1,43	0,70 ^{Bab} ± 0,04
Dia 15	0,53 ^{Ac} ± 0,52	0,93 ^{Abc} ± 0,10	1,19 ^{ABbc} ± 0,21	2,84 ^{Aa} ± 0,37	1,53 ^{Ab} ± 0,16
Dia 22	0,68 ^{Ac} ± 0,05	1,41 ^{Abc} ± 0,36	2,24 ^{Aab} ± 1,09	3,07 ^{Aa} ± 0,43	1,85 ^{Aabc} ± 0,24
Amostra	Coesividade				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,25 ^{Aa} ± 0,36	0,34 ^{Aa} ± 0,10	0,32 ^{Ba} ± 0,06	0,39 ^{Aa} ± 0,01	0,47 ^{Aa} ± 0,20
Dia 8	0,54 ^{Aa} ± 0,11	0,31 ^{Aab} ± 0,02	0,28 ^{Bb} ± 0,05	0,47 ^{Aab} ± 0,17	0,34 ^{Aab} ± 0,01
Dia 15	0,36 ^{Aab} ± 0,06	0,28 ^{Ab} ± 0,07	0,26 ^{Bb} ± 0,02	0,35 ^{Aab} ± 0,06	0,43 ^{Aa} ± 0,04
Dia 22	0,26 ^{Ab} ± 0,07	0,24 ^{Ab} ± 0,05	0,45 ^{Aa} ± 0,01	0,34 ^{Aab} ± 0,05	0,40 ^{Aa} ± 0,04
Amostra	Gomosidade (N)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,77 ^{Aa} ± 0,52	1,61 ^{Ba} ± 0,41	1,23 ^{Ba} ± 0,61	0,53 ^{Aa} ± 0,05	0,78 ^{Ca} ± 0,21
Dia 8	1,54 ^{Abc} ± 0,30	1,63 ^{Bbc} ± 0,28	2,99 ^{Aba} ± 0,19	1,28 ^{Ac} ± 0,16	2,30 ^{Bab} ± 0,64
Dia 15	1,58 ^{Aa} ± 0,39	1,69 ^{Ba} ± 0,19	3,37 ^{Aa} ± 1,41	1,31 ^{Aa} ± 0,93	3,03 ^{Abc} ± 0,12
Dia 22	1,64 ^{Aa} ± 0,07	3,35 ^{Aa} ± 1,11	3,20 ^{Aba} ± 0,23	2,32 ^{Aa} ± 1,00	3,27 ^{Aa} ± 0,19
Amostra	Mastigabilidade (J)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,46 ^{Aa} ± 0,33	0,33 ^{Aa} ± 0,10	0,31 ^{Aa} ± 0,06	0,35 ^{Aa} ± 0,01	0,46 ^{Aa} ± 0,21
Dia 8	0,05 ^{Aa} ± 0,03	0,08 ^{Ba} ± 0,07	0,07 ^{Ba} ± 0,05	0,02 ^{Ba} ± 0,01	0,04 ^{Ba} ± 0,05
Dia 15	0,01 ^{Ba} ± 0,01	0,01 ^{Ba} ± 0,01	0,04 ^{Ba} ± 0,03	0,02 ^{Ba} ± 0,01	0,05 ^{Ba} ± 0,01
Dia 22	0,01 ^{Ba} ± 0,01	0,04 ^{Ba} ± 0,01	0,05 ^{Ba} ± 0,05	0,02 ^{Ba} ± 0,01	0,05 ^{Ba} ± 0,03

Média ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.10$). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2021).

A medida de gomosidade instrumental fornece números que representam as informações sensoriais da densidade do alimento durante o processo de mastigação até a sua desintegração para ser facilmente engolido (SZCZESNIAK, 2002). Referente a esse parâmetro, as amostras acidificadas com um maior teor de LBA e igual proporção de LBA e ácido láctico (II, IV e V) apresentaram um aumento significativo no seu valor durante o período de armazenamento. Comparando as amostras entre si em cada dia de análise, não houve diferença significativa entre elas com exceção do primeiro dia, ou seja, o período de armazenamento influenciou na capacidade de desintegração do modelo de queijo.

É possível observar na TABELA 23 uma queda nos valores de mastigabilidade ao longo dos 22 dias de estudo. As diferenças registradas para cada amostra no decorrer do tempo de armazenamento (dias 1, 8, 15 e 22) são significativas. Comparando as amostras entre si, as mesmas não apresentaram diferença significativas ($p > 0,10$) em cada um dos dias analisados.

5.3.5 Capacidade antioxidante e quelante

A TABELA 24 mostra uma variação significativa entre os diferentes tratamentos para a capacidade antioxidante, no mesmo dia de análise. A capacidade antioxidante de todas as amostras aumentou durante os dias de armazenamento, com um pico de atividade ocorrendo no dia 15 (ABTS). Este fato pode ser explicado devido à provável liberação de compostos durante o processo de maturação dos queijos, os quais são responsáveis pelo aumento da capacidade antioxidante, como por exemplo, peptídeos bioativos, vitaminas e oligossacarídeos (DEL OLMO et al., 2018; SANTIAGO-LÓPEZ et al., 2018). O aumento da capacidade antioxidante no decorrer do armazenamento foi observado para todas as amostras, tanto para o método via ABTS quanto pelo método de FRAP.

O aumento da capacidade antioxidante com a maturação está de acordo com os relatos da literatura, que sugerem o efeito causado pela proteólise, devido a quebra das proteínas ocorre a liberação de peptídeos e aminoácidos solúveis com capacidade antioxidante (PERNA et al., 2015; RASHIDINEJAD et al., 2013; REVILLA et al., 2016). É provável que quantidades maiores de LBA - para queijos com pH mais baixo - possam resultar em maior atividade antioxidante.

TABELA 24 – CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUELANTE DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Amostra	ABTS (% de inibição)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	10,96 ^{Ce} ± 0,60	53,03 ^{Da} ± 0,51	38,24 ^{De} ± 0,17	33,61 ^{Dd} ± 0,75	49,79 ^{Cb} ± 0,60
Dia 8	74,04 ^{Bc} ± 0,10	77,49 ^{Bb} ± 0,10	77,86 ^{Bb} ± 0,28	71,25 ^{Cd} ± 0,18	79,62 ^{Ba} ± 0,18
Dia 15	74,80 ^{Ac} ± 0,12	88,72 ^{Aa} ± 0,18	85,46 ^{Ac} ± 0,11	84,35 ^{Ad} ± 0,38	87,12 ^{Ab} ± 0,12
Dia 22	74,36 ^{ABc} ± 0,15	66,36 ^{Cd} ± 0,63	77,14 ^{Cb} ± 0,32	79,26 ^{Ba} ± 0,86	79,77 ^{Ba} ± 0,88

Amostra	FRAP (% de inibição)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	35,46 ^{Db} ± 0,19	52,88 ^{Ca} ± 0,19	30,65 ^{De} ± 0,34	26,74 ^{Cd} ± 0,19	21,94 ^{De} ± 0,67
Dia 8	43,61 ^{Cc} ± 0,19	24,35 ^{De} ± 0,65	34,20 ^{Cd} ± 0,19	53,68 ^{Ba} ± 0,68	47,19 ^{Cb} ± 1,79
Dia 15	168,69 ^{Ba} ± 0,87	97,98 ^{Be} ± 0,87	113,84 ^{Ac} ± 0,87	151,52 ^{Ab} ± 1,52	119,19 ^{Ad} ± 4,63
Dia 22	224,75 ^{Aa} ± 0,87	116,16 ^{Ac} ± 1,75	112,63 ^{Bd} ± 0,87	151,01 ^{Ab} ± 0,87	111,11 ^{Be} ± 0,87

Amostra	Fe ²⁺ atividade quelante (%)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	70,75 ^{Aa} ± 0,36	62,85 ^{Cc} ± 0,50	71,44 ^{Aa} ± 0,63	69,73 ^{Bb} ± 0,54	51,01 ^{Bd} ± 0,24
Dia 8	68,76 ^{Bb} ± 0,11	52,95 ^{Ad} ± 0,05	65,79 ^{Bc} ± 0,81	71,63 ^{Aa} ± 0,15	59,79 ^{Ac} ± 0,52
Dia 15	57,44 ^{Db} ± 0,47	53,47 ^{Cc} ± 0,84	59,86 ^{Ca} ± 0,14	52,03 ^{Cc} ± 0,33	59,73 ^{Aa} ± 1,33
Dia 22	62,51 ^{Ca} ± 0,55	58,94 ^{Bb} ± 0,07	56,20 ^{De} ± 0,26	49,37 ^{Dd} ± 0,50	50,18 ^{Bd} ± 0,07

Amostra	Ca ²⁺ atividade quelante (%)				
	I	II	III	IV	V
Dia 1	33,73 ^{Aa} ± 5,97	14,90 ^{Ab} ± 2,43	18,08 ^{Ab} ± 3,51	17,88 ^{Ab} ± 4,02	18,50 ^{Ab} ± 3,38
Dia 8	14,56 ^{Ba} ± 3,37	14,09 ^{ABa} ± 2,41	11,21 ^{Aa} ± 1,73	16,57 ^{Aa} ± 5,05	15,15 ^{ABa} ± 5,29
Dia 15	21,77 ^{Ba} ± 6,27	12,94 ^{Aa} ± 9,10	13,12 ^{Aa} ± 5,35	20,17 ^{Aa} ± 4,81	11,27 ^{ABa} ± 3,13
Dia 22	14,27 ^{Ba} ± 2,09	9,96 ^{Bab} ± 1,28	13,99 ^{Aa} ± 3,25	12,08 ^{ABa} ± 3,95	7,57 ^{Bb} ± 1,52

Média ± desvio padrão de cada formulação ($n=3$). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.10$). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

Durante o período de armazenamento todas as amostras apresentaram redução significativa da capacidade quelante, tanto para o ferro (exceto para a amostra E, que retornou à atividade inicial) quanto para o cálcio (exceto amostras III e IV, que permaneceram inalteradas). A presença de um agente quelante pode alterar o equilíbrio entre proteína e mineral resultando em um aumento da repulsão entre os aminoácidos carregados negativamente nas micelas de caseína (DEWAN et al., 1972). A ação do quelante depende da sua capacidade e afinidade de se ligar ao cálcio, como demonstrado por Mizuno; Lucey, (2007).

A quebra gerada na estrutura da caseína causa ampliação do seu volume (repulsão eletrostática) devido à hidratação com aumento também da viscosidade das amostras (DE KORT ET AL., 2011). Todos os compostos os quais podem se ligar ao cálcio acabam por influenciar na digestão lipídica (HU et al., 2010) e afetar a digestão e metabolismo (MICHALSKI et al., 2013). Os íons de cálcio são capazes de aumentar a taxa de digestão lipídica devido à capacidade de se ligar a ácidos graxos de cadeia longa e precipita-los, sendo desta forma, a complexação de cálcio, positiva (HWANG et al., 2009).

O uso de compostos quelantes de cálcio (como fosfato dissódico, citrato trissódico e ácido etilenodiaminotetracético) possivelmente auxiliam na solubilização de Ca coloidal resultando na hidratação parcial da para-caseína insolúvel e na sua conversão em uma dispersão de para-caseinato de sódio solúvel em água (MCINTYRE et al., 2016). O processo tecnológico de fabricação de queijos processados e análogos pode influenciar o grau de desmineralização e hidratação da caseína.

A adição de agentes quelantes de cálcio durante a produção de queijo reduz a quantidade de cálcio insolúvel, resultando em alterações de reologia e fusão. A porcentagem de cálcio solúvel afeta a maturação desses produtos principalmente no primeiro mês. Estudos encontrados na literatura demonstram a alteração no teor de cálcio insolúvel durante a etapa de maturação, comprovando redução significativa nos primeiros 21 dias (queda de 70 para 56 % de cálcio insolúvel) (HASSAN et al., 2004; O'MAHONY et al., 2006).

5.3.6 Capacidade antimicrobiana

A análise estatística foi realizada entre as amostras e entre os dias de análise, separadamente para cada micro-organismo. No entanto, as amostras controle (positivas e negativas) foram analisadas em conjunto, para todos os micro-organismos. O micro-

organismo *B. cereus* foi o menos sensível à ação dos antimicrobianos presentes nas formulações de modelo de requeijão cremoso. A maioria das amostras, independentes da espécie microbiana, apresentaram perda de atividade antimicrobiana ao final dos 22 dias de armazenamento, com exceção do *S. aureus*, onde as formulações I, IV e V mantiveram sua inibição com formação do halo até o dia 22. As amostras I, II, III e IV mostraram uma diminuição em sua atividade contra *B. cereus* durante o período de armazenamento.

Dentre os micro-organismos analisados, a *L. monocytogenes* apresentou a maior sensibilidade na presença de extratos do modelo requeijão cremoso, com zonas de inibição entre 10 e 21,6 mm (TABELA 25). As amostras III, IV e V mostraram uma diminuição significativa na inibição com o armazenamento, ao contrário das amostras I e II que mantiveram sua ação contra *Listeria* inalterada.

TABELA 25 – CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS MODELOS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Halos de inibição (mm)					
<i>Bacillus cereus</i>					
Amostra	I	II	III	IV	V
Dia 1	8,7 ^{Aab} ± 0,8	0,0 ^{Bb} ± 0,0	2,3 ^{Aab} ± 4,0	6,3 ^{BCab} ± 5,6	4,3 ^{Aa} ± 0,8
Dia 8	9,7 ^{Aab} ± 0,6	14,0 ^{Aa} ± 3,0	0,0 ^{Ac} ± 0,0	13,0 ^{Aa} ± 1,0	6,0 ^{Abc} ± 4,2
Dia 15	0,0 ^{Bb} ± 0,0	13,0 ^{Aa} ± 2,0	0,0 ^{Ab} ± 0,0	11,5 ^{ABa} ± 0,5	11,5 ^{Aa} ± 0,5
Dia 22	0,0 ^{Bb} ± 0,0	0,0 ^{Bb} ± 0,0	0,0 ^{Ab} ± 0,0	0,0 ^{Cb} ± 0,0	9,5 ^{Aa} ± 0,5
Etanol 80 %*	0,0 ^D ± 0,0				
Cloramfenicol*	49,5 ^{AB} ± 2,1				
<i>Listeria monocytogenes</i>					
Amostra	I	II	III	IV	V
Dia 1	10,0 ^{Bb} ± 0,0	15,0 ^{Aab} ± 0,50	12,7 ^{Ab} ± 2,1	15,0 ^{Aab} ± 0,0	21,6 ^{Aa} ± 5,1
Dia 8	11,7 ^{Ab} ± 0,6	11,0 ^{Ab} ± 1,0	12,7 ^{Aab} ± 1,5	15,0 ^{Aa} ± 0,0	13,7 ^{Bab} ± 2,5
Dia 15	0,0 ^{Ca} ± 0,0	0,0 ^{Ba} ± 0,0	0,0 ^{Ba} ± 0,0	0,0 ^{Ba} ± 0,0	0,0 ^{Ca} ± 0,0
Dia 22	10,5 ^{Bb} ± 0,5	10,5 ^{Ab} ± 0,1	0,0 ^{Bc} ± 0,0	0,0 ^{Bc} ± 0,0	14,5 ^{Ba} ± 0,5
Etanol 80 %*	0,0 ^D ± 0,0				
Cloramfenicol*	50,5 ^A ± 0,7				
<i>Salmonella enteritidis</i>					
Amostra	I	II	III	IV	V
Dia 1	13,3 ^{Aa} ± 3,0	11,7 ^{Aa} ± 0,6	4,7 ^{ABa} ± 8,8	10,7 ^{Ba} ± 1,1	13,7 ^{Ba} ± 2,5
Dia 8	09,0 ^{Ac} ± 0,0	10,5 ^{Aac} ± 1,5	11,5 ^{Aab} ± 0,5	12,5 ^{Aa} ± 0,5	11,0 ^{Bab} ± 0,0
Dia 15	12,7 ^{Ab} ± 2,5	11,7 ^{Ab} ± 1,5	13,3 ^{Ab} ± 1,5	12,0 ^{ABb} ± 0,0	17,0 ^{Aa} ± 1,0
Dia 22	0,0 ^{Bb} ± 0,0	10,0 ^{Aa} ± 1,0	0,0 ^{Bb} ± 0,0	0,0 ^{Cb} ± 0,0	0,0 ^{Cb} ± 0,0
Etanol 80 %*	0,0 ^D ± 0,0				
Cloramfenicol*	46,0 ^{BC} ± 2,8				
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Amostra	I	II	III	IV	V
Dia 1	0,0 ^{Cc} ± 0,0	12,5 ^{Ab} ± 0,5	12,0 ^{Ab} ± 0,0	13,5 ^{Aab} ± 1,5	15,5 ^{Aa} ± 1,5
Dia 8	11,9 ^{Aab} ± 1,5	0,0 ^{Bc} ± 0,0	1,0 ^{Abc} ± 0,0	13,0 ^{Aab} ± 2,6	15,5 ^{Aa} ± 0,7
Dia 15	13,5 ^{Aa} ± 0,5	0,0 ^{Bb} ± 0,0	0,0 ^{Bb} ± 0,0	12,5 ^{Aa} ± 2,5	13,0 ^{Ba} ± 0,0
Dia 22	8,67 ^{Bab} ± 1,5	0,0 ^{Bc} ± 0,0	0,0 ^{Bc} ± 0,0	9,5 ^{Aa} ± 0,5	7,5 ^{Cb} ± 0,5 _{Cb}
Etanol 80 %*	0,0 ^D ± 0,0				
Cloramfenicol*	47,5 ^{ABC} ± 3,5				

Média ± desvio padrão de cada formulação (n=3). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as linhas, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre colunas, de acordo com o teste de Tukey (p < 0.10). Proporções: I – 100 % AL, II – 100 % LBA, III – 50:50, IV – 75 % AL:25 % LBA e V – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

Para *Salmonella*, as amostras foram menos efetivas com o tempo, exceto a amostra II, cujo efeito permaneceu inalterado até o final do período de armazenamento. Em relação a *S. aureus*, as amostras II e III perderam completamente o potencial inibitório do primeiro ao décimo quinto dia de análise. De todos os tratamentos, a amostra IV apresentou o maior controle do crescimento de *S. aureus* durante o período de armazenamento.

O controle negativo (etanol a 80 %) não apresentou ação inibitória contra os micro-organismos testados, portanto, os halos formados para as amostras não estão relacionados ao composto solvente (etanol a 80 %). O controle positivo formou halos de inibição entre 46 (*Salmonella*) e 50,5 mm (*Listeria*). A maioria das amostras apresentou atividade considerável até o 15º dia de armazenamento, com os maiores halos de inibição registrados para: *Listeria* > *S. aureus* > *Salmonella* > *Bacillus*.

A combinação de alguns tipos de ácidos, como o láctico, acético e levulínico permite uma ação antimicrobiana eficiente contra *Listeria* e *Salmonella* em alimentos (JIN; GURTLER, 2012), pois alteram o pH e evitam a invasão da célula epitelial, apresentando como consequência a inibição do desenvolvimento dos patógenos (EHSANI et al., 2019; SERVIN, 2004). O uso combinado de antimicrobianos pode ser uma alternativa para garantir o desenvolvimento de micro-organismos indesejados (BROWN et al., 2018). O sinergismo de ácidos orgânicos foi comprovado em estudo realizado por Pelaéz et al., (2012) (ácido acético e ácido láctico contra *Aspergillus flavus*) onde concentrações menores combinadas apresentaram-se mais eficientes que os ácidos na sua forma isolada.

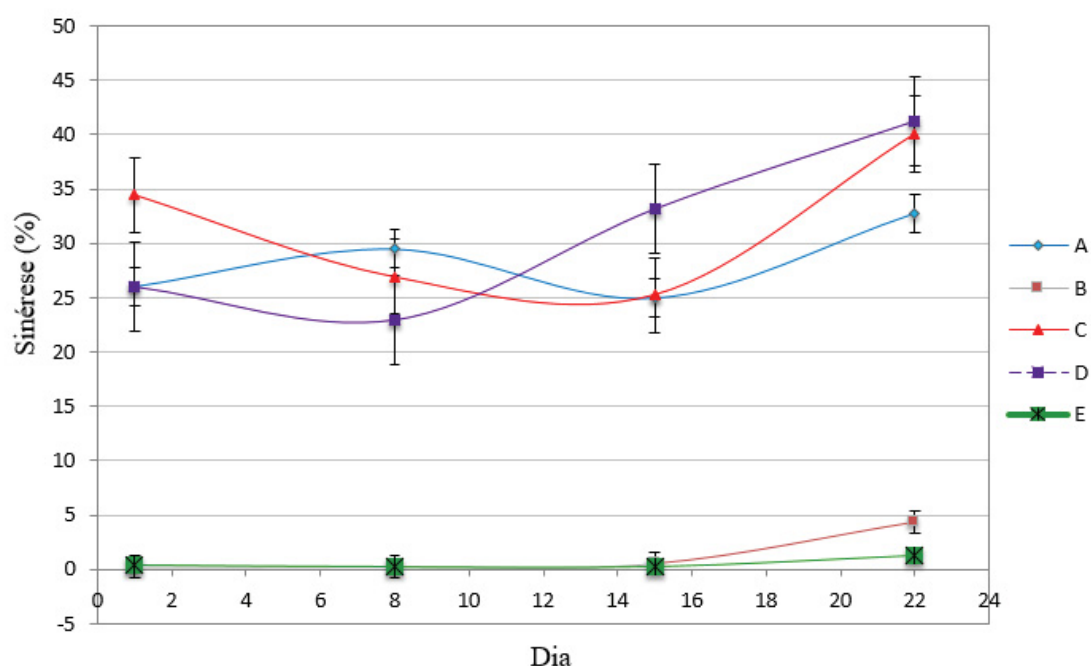
Os ácidos orgânicos (principalmente os fracos) apresentam inibição microbiana em função do alto pKa, isso ocorre devido a uma maior concentração da parte não dissociada do ácido, que é responsável pelo efeito bactericida. O ácido láctico, uma vez que possui um valor pKa maior do que o ácido lactobiônico, tem um efeito antimicrobiano também maior (GURTLER; MAI, 2014). Um ácido orgânico atua mais efetivamente na inibição microbiana por meio de penetração na membrana celular desses micro-organismos, onde sequencialmente ocorre a sua dissociação e liberação de componentes tóxicos que inibem os micro-organismos (LUES; THERON, 2012; WEISS et al., 2015). Quanto mais lipofílicos, maior a sua capacidade de atravessar a camada lipídica da célula, sendo mais efetivo como agente antimicrobiano (STRATFORD et al., 2013).

5.3.7 Sinérese e Rendimento

Para a maioria das amostras ocorreu uma queda da sinérese nos dias 8 e 15, com um pico de seu valor no último dia de armazenamento (dia 22). As amostras contendo as maiores frações de LBA (II e V) apresentaram o menor valor de sinérese em comparação as demais amostras. Isso ocorre devido a capacidade do LBA em armazenar água na sua estrutura, tornando essa expulsão de difícil ocorrência. Tal fato pode ser justificado também pelo pH, visto que as amostras acidificadas com LBA apresentam pH mais elevado e,

portanto, maior distanciamento do ponto isoelétrico da caseína (4,6), principal proteína do leite. De acordo com dados da literatura, o aumento do pH permite uma melhor hidratação das proteínas (maior interação caseína-água), o que induz a redução da sinérese (BROYARD; GAUCHERON, 2015; GAUCHERON et al., 2000; WOLFSCHOON-POMBO et al., 2018).

FIGURA 10- SINÉRESE DAS AMOSTRAS DE MODELO DE REQUEIJÃO CREMOSO



Proporções: A – 100 % AL, B – 100 % LBA, C – 50:50, D – 75 % AL:25 % LBA e E – 25 % AL:75 % LBA. FONTE: A autora (2019).

O rendimento de produção não apresentou diferença significativa entre as amostras, com valores entre 85,15 e 88,68 %, respectivamente, para as formulações I e V.

6 CONCLUSÃO

A solução do composto LBA foi avaliada quanto a sua capacidade antioxidante (DPPH e ABTS), quelante de íons de ferro e cálcio, apresentando valores significativos. Os valores estabelecidos indicam uma correlação entre as análises bem como uma proporcionalidade à concentração da solução. Sua ação antimicrobiana foi efetiva principalmente frente aos micro-organismos gram-positivos. Os resultados encontrados para a solução do composto LBA tornam-se um incentivo a sua aplicação em diferentes matrizes limentícias.

Modelos de requeijão cremoso acidificados, por meio de um planejamento de misturas, com LBA e ácido láctico foram produzidos e avaliados e os resultados encontrados reforçam a amplitude e potencial de aplicação do LBA na conservação e enriquecimento de alimentos. Os altos valores encontrados para solubilidade e adsorção reforça o otimismo quanto ao uso do LBA para aplicações na indústria alimentícia, visto que a sua capacidade de se ligar com a água está analiticamente evidente nessa matriz. Nota-se que esta finalidade deve ser função das características próprias do alimento alvo. Existem produtos onde a manutenção de água é algo desejável, gerando maior maciez e sensação de umidade. Em outros casos não, como alguns biscoitos e produtos em pó onde a crocância e a baixa a_w , por exemplo, são requeridas.

O LBA quando aplicado na produção de requeijão cremoso atua como agente acidificante efetivo, onde a formulação com 2 % de ácido apresenta pH, a_w e grau de sinérese semelhante ao requeijão cremoso comercial. A formulação G (20 minutos de incubação a 32 °C) do modelo de requeijão cremoso apresenta resultados de atividade antioxidante e quelante de ferro superiores às demais amostras analisadas (H, I, J, K e L).

Nos modelos de requeijão produzidos, não houve a incorporação de nenhum outro aditivo alimentar. O delineamento e avaliação neste projeto se deu sobre a atuação do LBA como único responsável pelos efeitos gerados nos modelos de requeijão.

Para as amostras acondicionadas sob refrigeração por 22 dias, foi possível observar no primeiro dia de armazenamento que a atividade antioxidante da amostra acidificada com LBA teve valor cinco vezes maior quando comparada à amostra acidificada com ácido láctico. Na mesma comparação, a amostra acidificada com LBA mostrou uma inibição 50 % maior do crescimento de *Listeria* quando comparada com a amostra acidificada com ácido láctico no primeiro dia de análise.

Alguns parâmetros passaram por modificações ao longo dos dias de armazenamento, indicando a maturação do produto, como é o caso da luminosidade, elasticidade (amostras III e IV), coesividade (amostra III) e gomosidade (amostras II, IV e V). Estas alterações estão dentro do esperado para o produto em questão.

Desta forma, foi comprovado um potencial uso do LBA como aditivo para a produção de alimentos, atuando como agente acidulante. Esse ácido apresentou atributos comparáveis no modelo de requeijão cremoso, àqueles gerados pelo emprego de outros ácidos, como o ácido láctico. O modelo produzido estava de acordo com os requisitos especificados pela legislação para requeijão cremoso.

Em uma eventual necessidade de se potencializar algum dos efeitos gerados pelos LBA, é muito provável que o aumento na sua concentração no meio alimentício gere um resultado positivo. No entanto, caso haja algum tipo de limitação técnica na quantidade empregada de LBA para a formulação de algum produto (como o pH, por exemplo), propõe-se sua utilização combinada a outros agentes químicos. Os custos mais elevados de produção dos modelos utilizando o LBA podem ser justificados pela sua funcionalidade, visto que, uma parcela de consumidores se dispõe a pagar mais caro por produtos diferenciados e de qualidade.

Com as atividades antioxidantes, antimicrobianas e quelantes aqui comprovadas, fica claro que o LBA pode ser mais que um ácido orgânico conservador de alimentos, podendo agir como enriquecedor dentro da matriz alimentícia. Foi possível comprovar ação antioxidante e antimicrobiana dos modelos de requeijão cremoso produzidos com LBA.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos adicionais sobre a aplicação de LBA em laticínios ou produtos alimentícios devem ser conduzidos para melhor compreender a contribuição desse composto nas matrizes orgânicas, não apenas em modelos. Devido à escassez de dados sobre aplicações em alimentos, espera-se em um futuro próximo, o uso do LBA para melhoramento tecnológico de processamento de alimentos, com foco na conservação de diversos produtos. Neste sentido, podem ser apontadas novas abordagens para avaliação deste componente, como a investigação de suas propriedades funcionais *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS

'THART, N. A. et al. New solutions in organ preservation. **Transplantation Reviews**, v. 16, n. 3, p. 131–141, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955470X02800027>>.

ABBADI, A. et al. New Ca-sequestering materials based on the oxidation of the hydrolysis products of lactose. **Green Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 231–235, 1999.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877–902, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>>.

ABEYKOON, C. D. et al. Milk Coagulation Properties and Milk Protein Genetic Variants of Three Cattle Breeds/Types in Sri Lanka. **Procedia Food Science**, v. 6, n. 2016, p. 348–351, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X16000717>>.

ACIDULANTES. Acidulantes - Funções e principais tipos. **Aditivos & Ingredientes**, p. 24–30, 2017.

AFFERTSHOLT, T. Market developments and industry challenges for lactose and lactose derivatives. In: Presentation at IDF Symposium Lactose and its derivatives, **Anais...**2007. Disponível em: <http://lactose.ru/present/1Tage_Affertsholt-Allen.pdf>.

AHMAD, S. K. et al. Toxicological studies on lactose oxidase from microdochium nivale expressed in Fusarium venenatum. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 3, p. 256–270, 2004.

AICHINGER, P. A. et al. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: Structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 31, n. 1–4, p. 243–255, 2003.

AINI, N. et al. Characteristics of cheese analogue from corn extract added by papain and pineapple extract. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 255, p. 012016, 2019. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1755-1315/255/i=1/a=012016?key=crossref.5a42c9ff5516edeeb8229bc162112251>>.

AKAR, Z.; KÜÇÜK, M.; DOĞAN, H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. **Journal of enzyme inhibition and medicinal**

chemistry, v. 32, n. 1, p. 640–647, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2017.1284068>>.

ALGIERT-ZIELIŃSKA, B.; MUCHA, P.; ROTSZTEJN, H. Lactic and lactobionic acids as typically moisturizing compounds. **International Journal of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 374–379, 2019.

ALMEIDA, M. L. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant potential fruit of *Ximenia americana* L. **Food Chemistry**, v. 192, p. 1078–1082, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.129>>.

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 196, n. 1, p. 314–323, 2015.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

ALVES DE OLIVEIRA, R. et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 219–239, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.03.003>>.

ALVES, R. M. V. et al. Effect of light and packages on stability of spreadable processed cheese. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 4, p. 365–373, 2007.

AMMAR, R. Ben et al. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 258–264, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.043>>.

ANGERMAYR, S. A. et al. Chirality matters: Synthesis and consumption of the D-enantiomer of lactic acid by *Synechocystis* sp. strain PCC6803. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 1295–1304, 18 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682849>>. Acesso em: 19 out. 2017.

ANVISA. **Registro ANVISA nº 80146501641 - Lactic Acid / Ácido Láctico - VÁLIDO**. Disponível em: <<https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodDetail&anvisaId=80146501641>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists International**. 18th. ed. Gathersburg: Official Methods, 2005.

BADEM, A.; UÇAR, G. Cheese Analogues. **Research & Reviews: Journal of Food and Dairy Technology**, v. 4, n. 3, p. 44–48, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008100596521113X>>.

BALAKRISHNAN, S.; CHAUDHARY, N. N.; JAIN, A. Lactobionic Acid: Significance and Application in Food and Pharmaceutical. **Intl. J. Food. Ferment**, v. 6, n. 1, p. 25–33, 2017. Disponível em: <<http://ndpublisher.in/admin/issues/IJFFv6n1c.pdf>>.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **Microbiology: A Centenary Perspective**, v. 36, n. 3, p. 40–44, 1966.

BELDA-GALBIS, C. M. et al. Antimicrobial activity of açaí against *Listeria innocua*. **Food Control**, v. 53, p. 212–216, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.018>>.

BELLAMY, W. et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1121, n. 1–2, p. 130–136, 1992.

BELSITO, P. C. et al. Manufacture of Requeijão cremoso processed cheese with galactooligosaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 869–875, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.021>>.

BENZIE, I. F. F.; DEVAKI, M. The ferric reducing / antioxidant power (FRAP) assay for non - enzymatic antioxidant capacity : concepts , procedures , limitations and applications. In: SHAHIDI, R. A. E. C. F. (Ed.). **Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications**. 1. ed. [s.l: s.n.]p. 77–104.

BEZERRA, A. D. A. et al. Análise da potabilidade de água de chafarizes de dois bairros do município de fortaleza, ceará. **ACTA Biomedica Brasiliensia**, v. 8, p. 24–34, 2017.

BISINELLA, R. Z. B. et al. Some instrumental methods applied in food chemistry to characterise lactulose and lactobionic acid. **Food Chemistry**, v. 220, n. 1, p. 295–298, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.018>>.

BITTENCOURT, R. H. F. P. de M. et al. Caracterização de requeijão marajoara e minas frescal produzidos com leite de búfalas no estado do Pará, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 9, p. 1687–1692, 2013.

BLOIS, M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.

Nature, v. 181, p. 1199–1200, 1958. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v181/n4617/pdf/1811199a0.pdf>>.

BORGES, P. F. Z. et al. Produção Piloto de Concentrados de Proteínas de Leite Bovino: Composição e Valor Nutritivo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 4, p. 1–8, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão ou Requesón. **Diário Oficial da União**, v. Brasília-D, 1997a.

BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 71–80, 2015.

BRICKLEY, C. A. et al. Influence of emulsifying salts on the textural properties of nonfat process cheese made from direct acid cheese bases. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 39–48, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0393>>.

BRIDEN, E. Hidroxiácidos. Ayer, hoy y mañana: agentes terapéuticos en Dermatología. **Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 6, p. 265–270, 2004.

BRIGHENTI, M. et al. Effects of processing conditions on the texture and rheological properties of model acid gels and cream cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6762–6775, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-14391>>.

BROWN, S. R. B.; KOZAK, S. M.; D'AMICO, D. J. Applications of Edible Coatings Formulated with Antimicrobials Inhibit *Listeria monocytogenes* Growth on Queso Fresco. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, n. January, p. 1–9, 2018.

BROYARD, C.; GAUCHERON, F. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. **Dairy Science and Technology**, v. 95, n. 6, p. 831–862, 2015.

BRUL, S. Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1–2, p. 1–17, set. 1999.

BUŇKA, F. et al. The effect of rework content addition on the microstructure

and viscoelastic properties of processed cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2956–2962, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13742>>.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>>.

CAO, J. et al. Antibacterial activity and mechanism of lactobionic acid against *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica**, 2019.

CARIC, M.; KALÁB, M. Processed cheese products. In: P. F. FOX, P. L. H. MCSWEENEY, & T. P. C. (Ed.). **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. 2nd. ed. London: Elsevier Applied Science, 1997. p. 467–505.

CARPENTER, C. E.; SMITH, J. V.; BROADBENT, J. R. Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. **Meat Science**, v. 88, n. 2, p. 256–260, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.032>>.

ČERVENKA, L. et al. Addition of rutin/quercetin to mixture to spreadable processed cheese: Antioxidant and textural characteristics. **Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v. 12, n. 1, p. 129–134, 2018.

CHARLOUX, C. et al. Inhibition of Hydroxyl Radical Production by lactobionate, adenine, and tempol. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 5, p. 699–704, 1995.

CHEMICAL BOOK. **Lactobionic acid price, buy Lactobionic acid - chemicalbook**. Disponível em: <<http://www.chemicalbook.com/Price/Lactobionic-acid.htm>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

CHEN, H.; ZHONG, Q. Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 260, n. 1, p. 36–41, 2017. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0168160517303574/1-s2.0-S0168160517303574-main.pdf?_tid=895754f6-9eb5-11e7-9ba3-00000aab0f6c&acdnat=1505988999_f415ad816ce3b19ca0882e75fac63739>.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 4, p. 345–358, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x>>. Acesso em: 17 out. 2017.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 809–816, 2005.

CIABOTTI, S. et al. Propriedades tecnológicas e sensoriais de produto similar ao tofu obtido pela adição de soro de leite ao extrato de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 346–353, 2009.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. a; CURRIE, C. R. Primer The natural history of antibiotics. **Current Biology**, v. 19, n. 11, p. 437–441, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096098220900918X>>.

CUEVA, C. et al. Antimicrobial Activity of Phenolic Acids against Commensal, Probiotic and Pathogenic Bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, jun. 2010.

DAL CASTEL, A. P. et al. Desenvolvimento De Requeijão Cremoso Sem Lactose. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 58–66, 2017.

DE KORT, E. et al. Effect of calcium chelators on physical changes in casein micelles in concentrated micellar casein solutions. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 12, p. 907–913, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.007>>.

DE SOUZA, C. A. G. et al. Encapsulação do ácido L-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: Preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 877–883, 2015.

DEL OLMO, A.; PICON, A.; NUÑEZ, M. Cheese supplementation with five species of edible seaweeds: Effect on microbiota, antioxidant activity, colour, texture and sensory characteristics. **International Dairy Journal**, v. 84, p. 36–45, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.004>>.

DEWAN, R. K. et al. Viscosity and Voluminosity of Bovine Milk Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 6, p. 699–705, 1972. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(73\)85236-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(73)85236-1)>.

DHANANJAY, S. Lactobionic Acid Market Growth, Size, Trends and Regional Forecast from 2017 to 2022. In: **Anais...2017**. Disponível em: <<https://www.linkedin.com/pulse/lactobionic-acid-market-growth-size-trends-regional-forecast-s>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S. Effect of temperature and chemical composition on processed cheese apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, v. 64, n. 2, p. 265–271, 2004.

DOS SANTOS, D. C.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 171–175, 2017.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

DUBAL, Z. B. et al. Effect of Food Grade Organic Acids on Inoculated *S. Aureus*, *L. Monocytogenes*, *E. Coli* and *S. Typhimurium* in Sheep/Goat Meat Stored at Refrigeration Temperature. **Meat Science**, v. 66, n. 4, p. 817–821, abr. 2004.

DUDONNÉ ET AL. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). **J. Agric. Food Chem**, v. 57, p. 1768–1774, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf803011r>>.

DUGAT-BONY, E. et al. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2502–2511, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10502>>.

DUPAS-LANGLET, M. et al. Characterization of saturated solutions and establishment of “aw-phase diagram” of ternary aqueous inorganic-organic and organic-organic systems. **Journal of Food Engineering**, v. 201, p. 42–48, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.009>>.

DUQUE, C. R. B. G. **Efeito Da Temperatura De Ativação , Ph E Tempo De Incubação Na Germinação De Esporos De Bactérias**. 1991. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1991.

DUSSELIER, M. et al. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. **Energy & Environmental Science**, v. 6, n. 5, p. 1415, 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ee00069a>>.

EHSANI, A. et al. Antibacterial activity and sensory properties of *Heracleum persicum* essential oil, nisin, and *Lactobacillus acidophilus* against *Listeria*

monocytogenes in cheese. **Veterinary World**, v. 12, n. 1, p. 90–96, 2019.

EL-SAYED, MOHAMED, A.; SAMAH, MOHAMED, SAID, E.-S.; SALAH, AHMED, K. Manufacture of Processed Cheese Spread from Camel Cheese Based: Evaluation of Cheese Characteristics. **American Journal of Food Science and Nutrition Research**, v. 5, n. 4, p. 76–86, 2018. Disponível em: <<http://www.openscienceonline.com/journal/fsnr>>.

EL-SHAFEI, S. M. S.; ABDEEN, E. M. M.; ABOZED, S. S. Using Pomegranate Peel Extracts As Natural Antioxidant in Cream Cheese Manufactured From Goat'S Milk. **Zagazig Journal of Agricultural Research**, v. 44, n. 6, p. 2649–2664, 2017.

ELKOT, W.; KHALIL, O. Impact of Type of Filling on the Quality of Cream Cheese. **Journal of Food and Dairy Sciences**, v. 9, n. 6, p. 215–219, 2018.

EQUIPE ESTATCAMP. **Software Action** São Carlos - SP, Brasil Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, , 2014. . Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/>>.

ESCANDAR, G. M. et al. Iron(III) Complexes of Lactobionic Acid: Equilibrium and Structural Studies in Aqueous Solution. **Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions**, v. 20, n. 8, p. 1189–1192, 27 nov. 1994. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=DT9940001189>>.

ESPEJO-CARPIO, F. J. et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 175–183, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.04.002>>.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A. E. Cheese structure and current methods of analysis. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 759–773, 2008.

FANG, T. et al. Effects of polymerized whey protein prepared directly from cheese whey as fat replacer on physiochemical, texture, microstructure and sensory properties of low-fat set yogurt. **Food Science and Technology**, v. 115, n. 108268, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108268>>.

FARAG, R. S. et al. Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 9, p. 665–667, set. 1989.

FARDET, A.; ROCK, E. In vitro and in vivo antioxidant potential of milks, yoghurts, fermented milks and cheeses: a narrative review of evidence. **Nutrition Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2017. Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422417000191/type/journal_article>.

FERRÃO, L. L. et al. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, n. 2017, p. 137–147, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.018>>.

FISCHER, E.; MEYER, J. Oxydetion delr Milchsuckers. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 22, p. 361–364, 1889. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.18890220182/epdf>>.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Invited Review : Sensory and Mechanical Properties of Cheese Texture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1611–1624, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-703>>.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food Additive permitted for direct addition to food for human consumption**. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=00a67c19e315c084f47374873afc7154&mc=true&node=se21.3.172_1720&rgn=div8>. Acesso em: 2 nov. 2017.

FOSBERG (DAMIANO), H.; JOYNER (MELITO), H. S. The impact of NaCl replacement with KCl and CaCl₂ on cottage cheese cream dressing rheological behavior and consumer acceptance. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 73–84, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.10.003>>.

FOX, P. F. et al. Cheese: Structure, Rheology and Texture. In: **Fundamentals of Cheese Science**. Boston, MA: Springer US, 2017. p. 475–532.

FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T. M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 237–253, 1990.

FOX, P. P. F. et al. Cheese rheology and textur. In: **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen: Aspen Publishers, 2000. p. 587.

FU, W. et al. Effects of pre-cooked cheeses of different emulsifying conditions on mechanical properties and microstructure of processed cheese. **Food Chemistry**, v. 245, n. 1, p. 47–52, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.075>>.

GARCÍA, C. et al. A new synbiotic dairy food containing lactobionic acid and *Lactobacillus casei*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 1, p. 47–56,

2019.

GAUCHERON, F.; GRAËT, Y.; BRIARD, V. Effect of NaCl addition on the mineral equilibrium of concentrated and acidified casein micelles. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 82–86, 1 jan. 2000.

GILBERT, A. et al. Studying stirred yogurt microstructure using optical microscopy: How smoothing temperature and storage time affect microgel size related to syneresis. **Journal of Dairy Science**, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-16787>>.

GLATTFELD, J. W. E.; SCHIMPF, G. W. The Catalytic Hydrogenation of Aldonic Acid Delta and Gamma Lactones and of the Aldoses. **Journal of the American Chemical Society**, v. 57, n. 11, p. 2204–2208, 1935. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01314a050>>.

GODERSKA, K. The antioxidant and prebiotic properties of lactobionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 3737–3751, 2019.

GONZÁLEZ-DURRUTHY, M. et al. QSPR/QSAR-based Perturbation Theory approach and mechanistic electrochemical assays on carbon nanotubes with optimal properties against mitochondrial Fenton reaction experimentally induced by Fe²⁺-overload. **Carbon**, v. 115, p. 312–330, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2017.01.002>>.

GOUVEA, S.; ROSENTHAL, A.; HELENA, E. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses : a review. **Ciência Rural**, v. 47, n. 8, p. 1–9, 2017.

GRIMES, P. . et al. The use of polyhydroxy acids (PHAs) in photoages skin. **Dermage**, v. 73, p. 2–14, 2004.

GUIMARÃES, F. F. et al. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 726–730, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216307871>>.

GUINEE, T. Protein in Cheese and Cheese Products: Structure-Function Relationships. In: MCSWEENEY P., O. J. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry**. Eds ed. New York: Springer, 2016. p. 347–415.

GUINEE, T. P. Cheese: Cheese Rheology. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd. ed. Ireland: Elsevier, 2015. p. 685–697.

GUINEE, T. P. Pasteurized Processed and Imitation Cheese Products. In:

Cheese. 1. ed. Fermoy: Elsevier, 2017. p. 1133–1184.

GUINEE, T. P.; CARIČ, M.; KALÁB, M. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In: FOX, P. F. et al. (Ed.). **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. 3rd edn. ed. London: Elsevier Applied Science., 2004.

GUINEE, T. P.; FOX, P. F.; PRODUCTS, D. **Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects**. [s.l: s.n.]v. 1

GUPTA, S. K.; KARAHADIAN, C.; LINDSAY, R. C. Effect of Emulsifier Salts on Textural and Flavor Properties of Processed Cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 4, p. 764–778, 1984. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030284813673>>.

GURTLE, J. B.; MAI, L. T. Preservatives| Traditional Preservatives. In: 2 (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l: s.n.]p. 119–130.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 103–111, 2012a.

GUTIÉRREZ, L. F.; HAMOUDI, S.; BELKACEMI, K. Effective gold catalyst supported on mesoporous silica decorated by ceria for the synthesis of high value lactobionic acid. **Applied Catalysis A: General**, v. 425–426, p. 213–223, 2012b.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural Products as Antimicrobial Agents. **Food Control**, v. 46, p. 412–429, dez. 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 119, p. 1–85, 1990.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. MINIREVIEW Peptide Antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1317–1323, 1999.

HARB, T. B. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 2–6, 27 nov. 2016. Disponível em: <<http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.35838.69446>>.

HASSAN, A.; JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Changes in the proportions of soluble and insoluble calcium during the ripening of cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 854–862, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73229-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73229-4)>.

HICKEY, C. D. et al. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microbial localisation and their interactions during ripening : A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n. 2, p. 135–148, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.006>>.

HICKEY, D. K. et al. Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 30, n. 1, p. 53–58, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.11.006>>.

HIRPARA, K. et al. Influence of type of culture on compositional , physico-chemical , rheological and sensory attributes of Processed Cream Cheese based (PCCB) spread. **Indian Journal Dairy Science**, v. 69, n. 2, p. 1–7, 2016.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources I. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2–4, p. 87–107, 2000.

HOYOS-ARBELÁEZ, J.; VÁZQUEZ, M.; CONTRERAS-CALDERÓN, J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1371–1381, 2017.

HU, M. et al. Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 8, p. 719–725, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.010>>.

HUANG, C. et al. Tailored graphene oxide-doxorubicin nanovehicles via near-infrared dye-lactobionic acid conjugates for chemo-photothermal therapy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 545, p. 172–183, 2019.

HWANG, S. et al. Highly efficient production of monoglycerides by the continuous removal of fatty acids from lipase-catalyzed oil hydrolysis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 5–6, p. 290–295, 2009.

ISAACSON, Y. et al. Lactobionic acid as an iron chelator: A rationale for its effectiveness as an organ preservative. **Life Sciences**, v. 45, n. 24, p. 2373–2380, 1989.

ISLAM, T.; GANESAN, K.; XU, B. New Insight into Mycochemical Profiles and Antioxidant Potential of Edible and Medicinal Mushrooms: A Review. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, n. 3, p. 237–251, 2019.

IZSÓ, T. et al. Consumers' willingness to buy dairy product imitations

(analogues) based on structural equation modelling. **British Food Journal**, v. 121, n. 3, p. 835–848, 2019.

JIN, T.; GURTLE, J. B. Inactivation of Salmonella on Tomato Stem Scars by Edible Chitosan and Organic Acid Coatings. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1368–1372, 2012.

JOSHI, N. S.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; DAVE, R. I. Effect of Calcium on Microstructure and Meltability of Part Skim Mozzarella Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 1975–1985, 2004. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70014-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70014-4)>.

JUNG, J. et al. Physicochemical characteristics and antioxidant capacity in yogurt fortified with red ginseng extract. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 3, p. 412–420, 2016.

JURADO, M.; RUIZ-NAVARRO, P. Effects of fungal growth on the firmness of a cheese analogue formulated with different casein-to-fat ratios. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 145–151, 2018.

KAPOOR, R.; METZGER, L. E. Process cheese: Scientific and technological aspects - A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, n. 2, p. 194–214, 2008a.

KAPOOR, R.; METZGER, L. E. Process cheese: Scientific and technological aspects—A review. **Reviews in Food Science and Food**, v. 7, n. 2, p. 194–214, 2008b. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x/full>>.

KASHI, E. et al. Solvent extraction and separation of light rare earth elements (La, Pr and Nd) in the presence of lactic acid as a complexing agent by Cyanex 272 in kerosene and the effect of citric acid, acetic acid and Titriplex III as auxiliary agents. **Journal of Rare Earths**, v. 36, n. 3, p. 317–323, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jre.2017.09.016>>.

KEIM, S.; HINRICHS, J. Influence of stabilizing bonds on the texture properties of high-pressure-induced whey protein gels. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 355–363, 2004.

KHAN, I. T. et al. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. **Lipids in Health and Disease**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2019.

KHORSHIDIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 62–72, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856417303211>>.

KIM, A. et al. The Effects of Added Water and Grinding Temperature on Stability and Degradation Kinetics of Antioxidant Activity, Phenolic Compounds, and Ascorbic Acid in Ground Apples. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 12, p. 3019–3026, 2018.

KIM, K. et al. Physiochemical Analysis , Antioxidant Effects , and Sensory Characteristics of Quark Cheese Supplemented with Ginseng Extract. **Food Science pf Animal Resources**, v. 39, n. 2, p. 324–331, 2019.

KIRYU, T. et al. Involvement of *Acetobacter orientalis* in the production of lactobionic acid in Caucasian yogurt (“Caspian Sea yogurt”) in Japan. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 1, p. 25–34, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109260>>.

KNEIFEL, W. et al. Water-Holding Capacity of Proteins with Special Regard to Milk Proteins and Methodological Aspects—A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 7, p. 2027–2041, 1991.

KOÇ, B. et al. Physical properties of yoghurt powder produced by spray drying. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1377–1383, 2014.

KOKOH, K. B.; ALONSO-VANTE, N. Electrocatalytic oxidation of lactose on gold nanoparticle modified carbon in carbonate buffer. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 36, n. 2, p. 147–151, 2006.

KONGO, J. M.; MALCATA, F. X. **Cheese: Processing and Sensory Properties**. 1. ed. Porto: Elsevier Ltd., 2016.

KORNHAUSER, A.; COELHO, S. G.; HEARING, V. J. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 03, p. 135–142, 2010. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/applications-of-hydroxy-acids-classification-mechanisms-and-photoactiv-peer-reviewed-article-CCID>>.

KOUSTA, M. et al. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 805–815, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.015>>.

KOUTINA, G. et al. Calcium induced skim-milk gelation during heating as affected by pH. **Dairy Science and Technology**, v. 96, n. 1, p. 79–93, 2016.

KOUTINA, G.; KNUDSEN, J. C.; SKIBSTED, L. H. The effect of pH on calcium and phosphorus distribution between micellar and serum phase after enrichment of skim milk with calcium d-lactobionate. **Dairy Science and Technology**, v. 95, n. 1, p. 63–74, 2015.

KRISHNA, B. S. et al. Industrial production of lactic acid. **Comprehensive Biotechnology**, n. January, p. 208–217, 2019.

LAHOV, E.; REGELSON, W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 131–145, 1996.

LAMICHHANE, P.; KELLY, A. L.; SHEEHAN, J. J. Invited review: Structure-function relationships in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217309426>>.

LAWTON, M. R. et al. Short communication: Evaluation of commercial meat cultures to inhibit *Listeria monocytogenes* in a fresh cheese laboratory model. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1269–1275, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17203>>.

LEE, S. K. et al. Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 339–345, 2003.

LEFEBVRE-CASES, E. et al. Identification of Interactions among Casein Gels Using Dissociating Chemical Agents. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 4, p. 932–938, 1998.

LEMES, A. C. et al. A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 217–224, 2016.

LI, H. et al. The use of inulin, maltitol and lecithin as fat replacers and plasticizers in a model reduced-fat mozzarella cheese-like product. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.9835>>.

LI, R.; CARPENTER, J. A.; CHENEY, R. Sensory and Instrumental Properties of Sausage Made with Mechanically Separated Poultry (MSP) Meat and Wheat Protein. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 5, p. 1–7, 1998.

LIMA, K. R. et al. Perfil físico-químico e sensorial de requeijão cremoso obtido a partir de diferentes coagulantes. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e33710212455, 2021.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>>.

LORENZO, J. M. et al. Trends in Food Science & Technology Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, n. 1, p. 136–147, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>>.

LOURENÇO NETO, J. P. M. **Queijos: Aspectos tecnológicos. Manual Técnico para a Produção Industrial de Queijos**. 1. ed. São Paulo: Dipemar, 1994.

LUCERA, A. et al. Fruit and vegetable by-products to fortify spreadable cheese. **Antioxidants**, v. 7, n. 61, p. 1–10, 2018.

LUCEY, J. A. et al. Properties of acid casein gels made by acidification with glucono- δ -lactone. 2. Syneresis, permeability and microstructural properties. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 6–7, p. 389–397, 1997.

LUCEY, J. A. The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4–6, p. 603–608, 2001.

LUCEY, J. A. **Formation, Structural Properties, and Rheology of Acid-Coagulated Milk Gels**. 4. ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 1

LUCEY, J. A.; FOX, P. F. Importance of Calcium and Phosphate in Cheese Manufacture: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1714–1724, 1993. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77504-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77504-9)>.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited Review : Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2725–2743, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73869-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7)>.

LUCEY, J. A.; MADISON, W. Rennet-Induced Coagulation of Milk. In: **Cheese** |. Madison: Elsevier Ltd., 2011. p. 579–584.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529–542, 1997.

LUES, J. F. R.; THERON, M. M. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne listeria monocytogenes strains in vitro. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 12, p. 1126–1129, 2012.

MACHADO, G. M. et al. Viabilidade Tecnológica Do Uso De Ácido Lático Na Fabricação De Queijo De Coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 379, p. 5–15, 2011.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **The FASEB Journal**, v. 1, n. 6, p. 441–445, 1987.

MACLEAN, R. C. et al. The population genetics of antibiotic resistance: integrating molecular mechanisms and treatment contexts. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 6, p. 405–414, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg2778>>.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008.

MALVESSI, E. et al. Production of organic acids by periplasmic enzymes present in free and immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 1–10, 2013.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic Acids as Antimicrobials to Control Salmonella in Meat and Poultry Products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713–721, mar. 2012.

MARCHESSEAU, S.; CUQ, J. L. Water-Holding Capacity and Characterization of Protein Interactions in Processed Cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 3, p. 479–489, 1995.

MARRIOTT, N. G.; SCHILLING, M. W.; GRAVANI, R. B. Food Contamination Sources. In: **Principles of Food Sanitation**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 83–91.

MASOTTI, F. et al. Status and developments in analogue cheese formulations and functionalities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 158–169, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417307215>>.

MCCARTHY, T. L. et al. Evaluation of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin e in raw and cooked pork patties. **Meat Science**, v. 58, n. 1, p. 45–52, 2001.

MCINTYRE, I.; O’SULLIVAN, M.; O’RIORDAN, D. Effects of calcium

chelators on calcium distribution and protein solubility in rennet casein dispersions. **Food Chemistry**, v. 197, n. 1, p. 233–239, 2016.

MENABUE, L.; SALADINI, M.; UGOLETTI, N. Metal(II) binding by natural ionic glycosides: A solution study on 2,2'-bipyridine containing ternary systems of Cu(II) and Ni(II) with lactobionic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 217–222, 1998.

MEYER, A. **Process cheese manufacture**. London: Food Trade Press, 1973.

MIAO, J. et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 65, p. 63–72, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.023>>.

MICHALSKI, M. C. et al. Functionality of smaller vs control native milk fat globules in Emmental cheeses manufactured with adapted technologies. **Food Research International**, v. 40, n. 1, p. 191–202, 2007.

MICHALSKI, M. C. et al. Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 354–373, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.004>>.

MIZUNO, R.; LUCEY, J. A. Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium-phosphate-protein interactions in casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3070–3078, 2005. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72988-X](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72988-X)>.

MIZUNO, R.; LUCEY, J. A. Properties of milk protein gels formed by phosphates. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 10, p. 4524–4531, 2007.

MLEKO, S.; FOEGEDING, E. A. Physical properties of rennet casein gels and processed cheese analogs containing whey proteins. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 513–516, 2000.

MOKOONLALL, A.; NÖBEL, S.; HINRICHS, J. Post-processing of fermented milk to stirred products: Reviewing the effects on gel structure. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, p. 26–36, 2016.

MORDOR INTELLIGENCE. **Lactobionic Acid Market | Size | Analysis | Forecast to 2022**. Disponível em: <<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/lactobionic-acid-market>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

MORIN-SARDIN, S. et al. Effect of temperature, pH, and water activity on

Mucor spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food Microbiology**, v. 56, p. 69–79, 2016.

MORO, A. et al. Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 7, p. 1507–1513, 2015.

MUÑOZ, S. V. et al. A new study of the kinetics of curd production in the process of cheese manufacture. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2017, p. 1–5, 2017.

NAKANO H, KIRYU T, KISO T, M. H. Biocatalytic production of Lactobionic acid. In: HOU CT, S. J. (Ed.). **Biocatalysis and biomolecular engineering**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 391–404.

NAZÁRIO, G. Agentes acidulantes utilizados em alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 11, n. 1–2, p. 141–158, 1951.

NJUS, D. et al. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 159, n. 1, p. 37–43, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>>.

NOVAK, A. New applications of membrane processes. In: IDF Special. **International Dairy Federation**, v. 9201, n. Special Issue, p. 51–66, 1992.

NUNES, G. et al. Cottage cheese content reduced sodium chloride: physico-chemical and sensory characterization among teenagers. **Ambiência**, v. 14, n. 3, p. 662–677, 2018.

O'CALLAGHAN, D. J.; GUINEE, T. P. Rheology and texture of cheese. In: **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3. ed ed. London: Elsevier, 2004. p. 511–540.

O'MAHONY, J. A.; MCSWEENEY, P. L. H.; LUCEY, J. A. A model system for studying the effects of colloidal calcium phosphate concentration on the rheological properties of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 892–904, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72154-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72154-3)>.

OGUNLADE, A. O.; OYETAYO, V. O.; OJOKOH, A. O. Phytochemical Screening and Antioxidant Properties of Coagulants and Soft Cheese Produced from Goat Milk Using Different Biocoagulants of Plant Origin. **Asian Food Science Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2019.

OLIVEIRA, I. C.; MARTA, S.; SAAD, I. Processamento artesanal de queijo

caprino simbiótico tipo petit-suisse. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 1, p. 1–7, 2014.

OLIVEIRA, J. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. 1986. Unicamp, 1986.

OLIVEIRA, K. A. M. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de queijo minas frescal de leite de cabra desenvolvido por acidificação direta e fermentação láctica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 3, p. 166, 2016. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/533>>.

OLIVEIRA, R. B. A. et al. Occurrence, populations, diversity, and growth potential of spore-forming bacteria in “requeijão cremoso”. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. 1, p. 24–31, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.029>>.

OLSON, N. F.; PRICE, W. V. Composition and Bacterial Growth as Factors Affecting the Body of Pasteurized Process Cheese Spread. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 8, p. 1394–1404, 1961.

OSBORN, E. M. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 24, n. 6, p. 227–231, 1943.

PANG, Z. et al. Effect of addition of gelatin on the rheological and microstructural properties of acid milk protein gels. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 340–351, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.005>>.

PARK, C. Y. et al. Phenolics and antioxidant activity of aqueous turmeric extracts as affected by heating temperature and time. **Food Science and Technology**, v. 105, n. 2019, p. 149–155, 2019.

PARSONS, B. Antioxidants in Food: The Significance of Characterisation, Identification, Chemical and Biological Assays in Determining the Role of Antioxidants in Food. **Foods**, v. 6, n. 8, p. 68, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2304-8158/6/8/68>>.

PATEL, Y. et al. Dimensionless reynolds as number as a dimension for fluid mechanics in rheology. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, v. 5, n. 1, p. 25–30, 2017.

PATRAS, A. et al. Stability and Degradation Kinetics of Bioactive Compounds and Colour in Strawberry Jam during Storage. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 7, p. 1245–1252, 2011.

PAULA, J. C. J. de; CARVALHO, A. F. de; FURTADO, M. M. Princípios

básicos de fabricação de queijo: do histórico à saga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 19–25, 2009.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 58–62, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2014.959899>>.

PELÁEZ, A. M. et al. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. **Food Control**, v. 24, n. 1–2, p. 177–183, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.024>>.

PENG, C.; CHAN, M. N.; CHAN, C. K. The hygroscopic properties of dicarboxylic and multifunctional acids: Measurements and UNIFAC predictions. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 22, p. 4495–4501, 2001.

PENG, X.; XIONG, Y. L.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 196–201, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.068>>.

PEREIRA, E. P. R. et al. Oxidative stress in probiotic Petit Suisse: Is the jabuticaba skin extract a potential option? **Food Research International**, v. 81, p. 149–156, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.034>>.

PEREIRA, E. P. R. et al. Effect of incorporation of antioxidants on the chemical, rheological, and sensory properties of probiotic petit suisse cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1762–1772, 2016b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216000503>>.

PERNA, A. et al. Short communication: Effect of genetic type on antioxidant activity of Caciocavallo cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3690–3694, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9097>>.

PERREAULT, V. et al. Effect of denatured whey protein concentrate and its fractions on rennet-induced milk gels. **International Dairy Journal**, v. 64, p. 48–55, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12473>>.

PHARMANOSTRA. Certificado de análise Lote LA-17-041. In: Brazil. **Anais... Brazil**: 2017.

PIVETTA, F. P. et al. Addition of green banana biomass as partial substitute for fat and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* in requeijão cremoso processed cheese.

Food Science and Nutrition, v. 2061, n. 1, p. 1–7, 2019.

PIZATO, S.; SARAIVA, C. Screening de variáveis para a produção de biomassa e ácido láctico utilizando planejamento Plackett-Burman. **Journal of Bioenergy Food Science**, v. 02, n. 3, p. 117–128, 2015.

PLAYNE, M. J.; CRITTENDEN, R. G. Galacto-oligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. In: MCSWEENEY, P.; FOX, P. F. (Ed.). **Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents**. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 121–201.

PLEISSNER, D. et al. Biotechnological Production of Organic Acids from Renewable Resources. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017. p. 1–38.

PRATT, D. E.; BIRAC, M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1720–1722, 1979.

PRUDENCIO, I. D. et al. Petit suisse manufactured with cheese whey retentate and application of betalains and anthocyanins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 5, p. 905–910, 2008.

QURESHI, T. M. et al. Antioxidant potential of a soft cheese (paneer) supplemented with the extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars and its whey. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 10, p. 1591–1602, 2019.

RAMEL, P. R.; MARANGONI, A. G. Characterization of the polymorphism of milk fat within processed cheese products. **Food Structure**, v. 12, p. 15–25, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foostr.2017.03.001>>.

RAMESH, T. et al. Effect of fermented *Panax ginseng* extract (GINST) on oxidative stress and antioxidant activities in major organs of aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 1, p. 77–84, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2011.10.007>>.

RAO, S. S. et al. Lactobionic Acid as a New Synergist in Combination with Phosphonate-Zn(II) System for Corrosion Inhibition of Carbon Steel. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 77–89, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmst.2013.10.003>>.

RASHIDINEJAD, A. et al. Effects of catechin on the phenolic content and antioxidant properties of low-fat cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 12, p. 2448–2455, 2013.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E. J.; EVERETT, D. W. Antioxidant activity and recovery of green tea catechins in full-fat cheese following gastrointestinal simulated digestion. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 13–24, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.004>>.

RAYBAUDI-MASSILIA, R. M. et al. Use of Malic Acid and Other Quality Stabilizing Compounds to Assure the Safety of Fresh-Cut “Fuji” Apples by Inactivation of *Listeria Monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia Coli* O157:H7. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 2, p. 236–252, maio 2009.

RE, R. et al. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorizations Assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

RENZETTI, S.; JURGENS, A. Rheological and thermal behavior of food matrices during processing and storage: relevance for textural and nutritional quality of food. **Current Opinion in Food Science**, v. 9, p. 117–125, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.10.003>>.

RÉRAT, A. et al. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids. **British Journal of Nutrition**, v. 60, n. 01, p. 121, 2005.

RESCHKE, C. **Papel da gordura e do sal emulsificante em análogos de requeijão cremoso**. 2007. Universidade Estadual de Campinas, 2007.

REVILLA, I. et al. Antioxidant capacity of different cheeses: Affecting factors and prediction by near infrared spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5074–5082, 2016.

RIBEIRO, J. C. B. **Propriedades do ácido lactobiônico em modelos lácteos**. 2016. UFPR, 2016.

RIBEIRO, J. C. B. et al. Effect of lactobionic acid on the acidification, rheological properties and aroma release of dairy gels. **Food Chemistry**, v. 207, n. 1, p. 101–106, 2016.

RIGOTTI, M. et al. Antioxidant activity and total polyphenolic content of table wines from Serra Gaúcha. **Revista Uniplac**, v. 1, n. 1, p. 48–60, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311646485_Antioxidant_activity_and_total_polyphenolic_content_of_table_wines_from_Serra_Gaucha>.

RINALDONI, A. N. et al. Soft cheese-like product development enriched with

soy protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 139–147, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.003>>.

ROBINSON, R.; TAMIME, A.; WSZOLEK, M. Microbiology of Fermented Milks. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **Dairy Microbiology Handbook**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 367–430.

RODRIGUES, C. et al. Production and Application of Lactic Acid. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 543–556, 2016.

RODRIGUES, L. B. O. et al. Rheological and textural studies of arrowroot (Maranta arundinacea) starch–sucrose–whey protein concentrate gels. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 2974–2984, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-018-3215-x>>.

ROLDÁN, V. et al. Kinetics and mechanism of the reduction of Cr(VI) and Cr(V) by d-lactobionic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 347–357, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013403004422>>.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, v. 23, n. 2, p. 1–4, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.006>><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800085>http://www.cnpat.embrapa.br/download_publicacao.php?id=209<http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009>>.

RUFINO, M. do S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>>.

RUIZ, J. F. V. et al. Rheological properties of selected dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 37–41, 2009.

RUSCIANO, D. et al. Age-Related Dry Eye Lactoferrin and Lactobionic Acid. **Ophthalmic Research**, v. 60, n. 2, p. 94–99, 27 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/489093>>.

SAARELA, M. et al. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic Lactobacillus strains. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 4, p. 291–302, 2003.

SANTIAGO-LÓPEZ, L. et al. Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3742–3757, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13465>>.

SANTOS, J. S.; ALVARENGA BRIZOLA, V. R.; GRANATO, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, v. 214, p. 515–522, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.091>>.

SCHOLNICK, F.; PFEFFER, P. E. Iron Chelating Capacity of Gluconamides and Lactobionamides. **Journal Dairy Science**, v. 63, p. 471–473, 1980.

SEERAM, N. P. et al. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1415–1422, 2008.

SELEET, F. L. et al. Production of Functional Spreadable Processed Cheese Analogue Supplemented with Chickpea. **International Journal of Dairy Science**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2014.

SEMAN, S. et al. Production and stability of nisin in whey protein concentrate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 125–129, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.031>>.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 4, p. 405–440, 2004.

SHEBIS, Y. et al. Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food and Nutrition Sciences**, v. 04, n. 06, p. 643–649, 2013. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/fns.2013.46083>>.

SHEEHAN, J. J.; GUINEE, T. P. Effect of pH and calcium level on the biochemical, textural and functional properties of reduced-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 2, p. 161–172, 2004.

SHEN, X. et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.040>>.

SHIRASHOJI, N.; JAEGGI, J. J.; LUCEY, J. A. Effect of Trisodium Citrate Concentration and Cooking Time on the Physicochemical Properties of Pasteurized

Process Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 15–28, 2006. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72065-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72065-3)>.

SHIVAKUMAR, A.; YOGENDRA KUMAR, M. S. Critical Review on the Analytical Mechanistic Steps in the Evaluation of Antioxidant Activity. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 214–236, 2018.

SHOEMAKER, C.F.; NANTZ, J.; BONNANS, S.; NOBLE, A. C. Rheological characterization of dairy products. **Food Technology**, v. 46, n. 1, p. 98–104, 1992.

SIBEL AKALIN, A. Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 79–95, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.002>>.

SIGMA-ALDRICH. **Product specification**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com>.

SILVA, N. F. N. et al. Combined effect of transglutaminase and sodium citrate on the microstructure and rheological properties of acid milk gel. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 304–311, 2018.

SIPAHIOGLU, O.; ALVAREZ, V. B.; SOLANO-LOPEZ, C. Structure, physico-chemical and sensory properties of feta cheese made with tapioca starch and lecithin as fat mimetics. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 11, p. 783–789, 1999.

SOŁOWIEJ, B. et al. The effect of fat replacement by inulin on the physicochemical properties and microstructure of acid casein processed cheese analogues with added whey protein polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 1–11, 2014.

SOŁOWIEJ, B.; NASTAJ, M. Relevance and Production of Dairy Analogues and Restructured Dairy Products. **Reference Module in Food Science**, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965030985>>.

SOUZA, V. R. de et al. Efeito da concentração de gordura nas propriedades físicas, químicas e sensoriais do queijo petit suisse elaborado com retenção de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 20–28, 2012.

STANCIL, W. C.; JORDAN, D. **Precise color communication**. Disponível em: <<https://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/index.html>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

STODOLA, F. H. H.; LOCKWOOD, L. B. The oxidation of lactose and maltose to bionic acids by *Pseudomonas*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 1, p. 213–221, 1947. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/171/1/213.short>>.

STRATFORD, M. et al. Weak-acid preservatives: PH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 164–171, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.013>>.

SUETSUNA, K.; UKEDA, H.; OCHI, H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n. 3, p. 128–131, 2000.

SUN, N. et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 58, p. 140–148, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.004>>.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 4, p. 215–225, 2002.

TANG, S. Z. et al. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 45–51, 2002.

TAPPI, S. et al. Computer vision system (CVS): a powerful non-destructive technique for the assessment of red mullet (*Mullus barbatus*) freshness. **European Food Research and Technology**, v. 243, n. 12, p. 1–9, 2017.

TASIC-KOSTOV, M. et al. Lactobionic acid as antioxidant and moisturizing active in alkyl polyglucoside-based topical emulsions: The colloidal structure, stability and efficacy evaluation. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 5, p. 424–434, 2012.

TASIĆ-KOSTOV, M.; LUKIĆ, M.; SAVIĆ, S. A 10% Lactobionic acid-containing moisturizer reduces skin surface pH without irritation—An in vivo/in vitro study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2019.

TERESITA, S. et al. Production of Antioxidant and ACEI Peptides from Cheese Whey Discarded from Mexican White Cheese Production. **Antioxidants**, v. 8, n. 158, p. 1–10, 2019.

TODARO, M. et al. Effect of refrigerated storage on microbiological, chemical and sensory characteristics of a ewes' raw milk stretched cheese. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 11, p. 67–73, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.005>>.

TONG, L. M. et al. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1325–1329, 2000.

TOPAL, M. et al. Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 266–275, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2015.1018244>>.

TORRES, I. C. et al. Effect of homogenisation in formation of thermally induced aggregates in a non- and low- fat milk model system with microparticulated whey proteins. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 02, p. 229–238, 2017. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S002202991700019X/type/journal_article>.

TRMČIĆ, A. et al. Consensus categorization of cheese based on water activity and pH—A rational approach to systemizing cheese diversity. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 841–847, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216307469>>.

TURNER, T. L. et al. Short communication: Conversion of lactose and whey into lactic acid by engineered yeast. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 124–128, 1 jan. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216307895>>. Acesso em: 3 out. 2017.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus Cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, abr. 2002.

VAN DENDER, A. G. F. Alternativas tecnológicas para a fabricação de requeijão cremoso e queijos fundidos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 381–389, 2001.

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

VAN DOKKUM, W. et al. The tolerance of lactobionic acid in Man. **TNO Nutrition and Food Research**, v. 95, n. 115, p. 1–22, 1994. Disponível em:

<http://ewpa.euromilk.org/fileadmin/user_upload/Public_Documents/EWPA_Publications/The_tolerance_of_lactobionic_acid_in_Man.pdf>.

VAVRUSOVA, M.; SKIBSTED, L. H. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, P2, p. 1198–1204, 2014.

VIDIGAL, M. C. T. R. et al. Effect of whey protein concentrate on texture of fat-free desserts: sensory and instrumental measurements. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 2, p. 412–418, 2012.

WALSTRA, P. The syneresis of curd. In: CHAPMAN, P. F. F. (Ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 2. ed. [s.l: s.n.]p. 141–191.

WANG, C. et al. Efficacy of lactic acid in reducing foodborne pathogens in minimally processed lotus sprouts. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 721–726, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.024>>.

WANG, C. et al. Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. **Food Control**, v. 46, p. 525–531, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.024>>.

WANG, J. et al. Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in Cheddar cheese production. **Food Science and Technology**, v. 97, n. 11, p. 419–426, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.011>>.

WANG, M.-Y. et al. Antioxidant activity of yichun blue honeysuckle (YBHS) berry counteracts CCl₄-induced toxicity in liver injury model of mice. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 1–11, 2017.

WANG, X. et al. Bromelain-immobilized and lactobionic acid-modified chitosan nanoparticles for enhanced drug penetration in tumor tissues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 129–142, 2018b.

WANGCHAROEN, W.; MORASUK, W. Antioxidant capacity and phenolic content of some Thai culinary plants. **Journal of Science and Technology**, v. 01, n. 02, p. 100–106, 2007.

WATKINSON, P. et al. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4–7, p. 455–464, 2001.

WEE, Y. J. et al. Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 431–435, 2006.

WEE, Y.; KIM, J.; RYU, H. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006. Disponível em: <<http://www.ftb.com.hr/index.php/archives/80-volume-44-issue-no-2/445>>.

WEISS, J.; LOEFFLER, M.; TERJUNG, N. The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, n. May, p. 69–75, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>>.

WEMMENHOVE, E. et al. How NaCl and water content determine water activity during ripening of Gouda cheese, and the predicted effect on inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5192–5201, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10523>>.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; DANG, B. P.; CHIRIBOGA CHIRIBOGA, B. Forced syneresis determination results from commercial cream cheese samples. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 129–136, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.05.006>>.

ZACCHERIA, F. et al. From the Dairy Industry †. **Green Chemistry**, v. 19, p. 1904–1910, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c7gc00741h>>.

ZEHREN, V. L.; NUSBAUM, D. D. **Process cheese**. 2nd ed ed. [s.l.] Madison: Cheese Reporter Publishing Company., 1992.

ZHAO, D. et al. Effect of Storage on Lactase-Treated β -Casein and β -Lactoglobulin with Respect to Bitter Peptide Formation and Subsequent in Vitro Digestibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 38, p. 8409–8417, 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.7b02985>>.

ANEXOS

Anexo A: Correspondência com a ANVISA



06/11/2017

Gmail - Fwd:

Anvisa - Resposta ao Protocolo 2017862367

Tais

Cardoso

[<taaiscardoso33@gmail.com>](mailto:taaiscardoso33@gmail.com)

Fwd: Anvisa - Resposta ao Protocolo 2017862367

De: Central de Atendimento ao Público-Anvisa
atendimento.central@anvisa.gov.br> Data: 31 de outubro de 2017 08:28

Assunto: Anvisa - Resposta ao Protocolo 2017862367

Prezado (a) Senhor (a),

Em atenção a sua solicitação, informamos que não há registro do produto na base de dados da GGALI-Gerência- Geral de Alimentos.

O produto também não passou por avaliação de segurança.

Por favor, avalie a resposta recebida acessando o link:
<https://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/241521?lang=pt-BR&encode=>

Atenciosamente, Anvisa Atende Central de Atendimento

Agência Nacional de Vigilância Sanitária 0800 642 9782

www.anvisa.gov.br Siga a Anvisa: [www.twitter.com/anvisa_oficial](https://twitter.com/anvisa_oficial)

Este endereço eletrônico está habilitado apenas para enviar e-mails. Caso deseje entrar em contato com a central, favor ligar no 0800 642 9782 ou acessar o “Fale Conosco”, disponível no portal da ANVISA (link: <http://portal.anvisa.gov.br/fale-conosco>). As ligações podem ser feitas de segunda a sexta-feira, das 7h30 às 19h30, exceto feriados.

https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=2ded10c453&jsver=0Zr3VN2LtRw.pt_BR.&view=pt&msg=15f920aa77ece5f8&search=inbox&siml=15f9... 1/1