



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Ana Paula Barth

**EFEITO DO pH NA HIDRÓLISE DE FOSFATOS, TEXTURA E PROPRIEDADES
FUNCIONAIS DE REQUEIJÃO CREMOSO**

Campinas

2016

Ana Paula Barth

**EFEITO DO pH NA HIDRÓLISE DE FOSFATOS, TEXTURA E PROPRIEDADES
FUNCIONAIS DE REQUEIJÃO CREMOSO**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestra em Tecnologia de Alimentos*

Orientadora: **Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto**

Coorientador: **Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena**

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida pela aluna Ana Paula
Barth e orientada pela Prof^a Dra. Walkiria
Hanada Viotto

Campinas

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano – CRB 8/5816

Barth, Ana Paula, 1991-
B282e Efeito do pH na hidrólise de fosfatos, textura e propriedades funcionais de requeijão cremoso / Ana Paula Barth. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Walkiria Hanada Viotto.
Coorientador: Cláudio Francisco Tormena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Requeijão cremoso. 2. Polifosfatos. 3. Hidrólise. I. Viotto, Walkiria Hanada. II. Tormena, Cláudio Francisco. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of pH on phosphate hydrolysis, texture and functional properties of the spreadable process cheese

Palavras-chave em inglês:

Process cheese

Polyphosphates

Hydrolysis

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Walkiria Hanada Viotto [Orientador]

Patricia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Salvador Massaguer Roig

Data de defesa: 01-04-2016

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

PROFA. DRA. WALKIRIA HANADA VIOTTO (ORIENTADORA)

Universidade Estadual de Campinas

**DRA. PATRICIA BLUMER ZACARCHENCO RODRIGUES DE SÁ (MEMBRO
TITULAR) ITAL- Tecnolat**

PROF. DR. SALVADOR MASSAGUER ROIG (MEMBRO TITULAR)

Fund. Tropical Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”

DRA. CLARISSA RESCHKE CUNHA (MEMBRO SUPLENTE)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

PROFA. DRA. PRICILA VEIGA DOS SANTOS (MEMBRO SUPLENTE)

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos Membros Titulares encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna Ana Paula Barth.

Aos meus pais, José e Marlene.

In memoriam

À Vó Nida,

Que foi minha inspiração todos
os dias para realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Professora Walkiria Hanada Viotto, por ter me dado a oportunidade de ingressar na carreira acadêmica, pela valiosa orientação, tanto na dissertação como nas disciplinas e estágio docente e, sobretudo, pela amizade e confiança durante todo o período do mestrado.

Ao Professor Cláudio Tormena, por ter aceitado participar da produção deste trabalho, pela preciosa orientação, pelo apoio e paciência em me ensinar e por ter cedido o laboratório de RMN para as análises.

Aos meus pais, José e Marlene, pelo total apoio que me deram durante toda a vida. Por sempre acreditarem em mim e fazerem de tudo para que eu pudesse seguir a carreira que tanto sonhei.

Ao Diego, pelo amor, carinho e, principalmente, paciência e apoio incondicional nas horas difíceis. Por ser meu companheiro e parceiro em todos os momentos.

Ao meu irmão Aurélio, pela torcida, carinho e apoio de sempre.

Ao professor Salvador, às professoras Pricila e Patricia e também à Clarissa pelas correções e sugestões para melhoria do trabalho.

À Débora e à Teka, pela linda amizade que construímos, pelo apoio incondicional, principalmente nas horas de aperto.

À Carol, Diogo, Willian, Lígia e Juliana pela amizade e companheirismo todos os dias, pela ajuda no laboratório e análise dos dados.

Aos amigos da salinha, Mayara, Rodolfo, Vitor, Camila, Iara e Aninha, pela amizade e companheirismo todos os dias.

À Bete, pela amizade e por toda ajuda e conhecimento que me passou durante as análises no laboratório.

Ao Gustavo, Paula e Anderson, técnicos do laboratório de RMN, por toda a ajuda durante a execução das análises, principalmente nos fins de semana.

Ao professor Edvaldo e ao Manazael, pela ajuda e orientação.

À ALIBRA, pela doação do caseinato de cálcio, sem o qual a realização do trabalho não seria possível.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O requeijão cremoso é um dos tipos de queijos processados mais consumidos no Brasil. Para sua produção é necessária a utilização de sais emulsificantes, geralmente polifosfatos de sódio, capazes de promover os fenômenos de peptização e cremificação da massa. O requeijão pode ser obtido a partir de diferentes tipos de massa que diferem entre si, principalmente, pelo pH. O pH é um dos fatores que mais influenciam a funcionalidade e textura de queijos. Além disso, pHs ácidos também são conhecidos como agentes catalisadores de reações de hidrólise de polifosfatos. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do pH (5,2, 5,6, 6,0, 6,4, 6,8) sobre a hidrólise dos polifosfatos adicionados durante a fabricação do requeijão e seus efeitos sobre a composição química, propriedades de textura e microestrutura dos queijos. O trabalho foi dividido em duas etapas: 1) efeito do pH na hidrólise de polifosfatos em água, leite e em solução de caseinato de cálcio por espectroscopia de RMN de ^{31}P ; e 2) efeito do pH na hidrólise de polifosfatos e propriedades funcionais de requeijão cremoso. Em água e leite, a taxa de hidrólise aumentou com a diminuição do pH, sendo maior em leite devido à presença dos íons Ca^{2+} . No caseinato de cálcio, a maior taxa de hidrólise ocorreu à pH 5,6 ao invés do pH 5,2, provavelmente em função do efeito conjunto dos íons H^+ e maior mobilidade molecular. O comportamento da hidrólise dos polifosfatos no requeijão foi similar ao ocorrido no caseinato de cálcio. No requeijão cremoso, a hidrólise foi mais intensa do que no caseinato de cálcio, provavelmente devido ao alto grau de agitação a que o requeijão é submetido durante o processo. O pH também influenciou os parâmetros de textura e microestrutura dos queijos. Os requeijões fabricados a partir de massas com menores valores de pH (5,2 e 5,6) apresentaram maior firmeza e adesividade, com a presença de grandes agregados proteicos, como revelado pela microestrutura dos queijos. A pHs mais elevados (6,0 a 6,8), os requeijões apresentaram uma diminuição da firmeza e adesividade, apresentando uma rede proteica mais densa e homogênea, com maior absorção de água pela matriz.

Palavras-chave: Requeijão cremoso; polifosfatos; hidrólise.

ABSTRACT

“Requeijão cremoso” is the most consumed spreadable process cheese variety in Brazil. For its production, it is necessary to use emulsifying salts, generally sodium polyphosphates, capable of promoting the phenomenon of curd peptization and creaming. The “requeijão” may be obtained from different types of curd, which differ mainly by pH. The pH is one of the factors that has the major influence at the functionality and texture of cheese. Furthermore, acid pHs are also known as catalysts agents polyphosphates hydrolysis reactions. The aim of this study was to evaluate the effect of pH (5,2, 5,6, 6,0, 6,4, 6,8) on the hydrolysis of polyphosphates added during the manufacture of cheese and its effect on the chemical composition, texture properties and microstructure of cheeses. The study was divided into two parts: 1) effect of pH on hydrolysis of polyphosphates in water, milk and in a solution of calcium caseinate by ^{31}P NMR spectroscopy; 2) Effect of pH on hydrolysis of polyphosphates and functional properties of “requeijão cremoso”. In water and milk, the rate of hydrolysis increased with decreasing pH, which is higher in milk due to the presence of Ca^{2+} ions. In calcium caseinate, the high rate of hydrolysis takes place at pH 5,6 instead of pH 5,2, probably due to the combined effect of H^+ ions and higher molecular mobility. The behavior of polyphosphate hydrolysis in “requeijão” was similar to the calcium caseinate. In “requeijão cremoso” the hydrolysis was higher than those in calcium caseinate, probably due to the high degree of agitation to which the “requeijão cremoso” is subjected during the process. The pH also influenced the parameters of texture and microstructure of the cheeses. Cheeses made from curd with lower pH values (5.2 and 5.6) showed greater hardness and adhesiveness, with presence of large protein aggregates, as disclosed by the microstructure of the cheeses. The “requeijão cremoso” made with curds with higher pH values (6.0 to 6,8) showed lower values for hardness and adhesiveness and a more dense and homogeneous protein network with higher water absorption by the matrix.

Key-words: process cheese; sodium polyphosphates; hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Estrutura química do ortofosfato, pirofosfato e de um polifosfato com n átomos de fósforo na cadeia (onde n pode variar de 3 até mais 200).....19
- Figura 2.** Mecanismo de ação do sal emulsificante.....20

CAPÍTULO I

- Figura 1.1.** Espectro de RMN de ^{31}P do sal de polifosfato comercial em água em pH 6,8 a 25°C39
- Figura 1.2.** Porcentagem de hidrólise dos polifosfatos em água, leite e caseinato de cálcio em diferentes pHs.....41

CAPÍTULO II

- Figura 2.1.** Espectro de RMN de ^{31}P do requeijão cremoso modelo em que foi adicionado sal de polifosfato comercial, em pH 6,8 a 10°C. LB de 20 MHz, após 10 dias de armazenamento refrigerado.....55
- Figura 2.2.** Efeito do pH na hidrólise dos polifosfatos em requeijões produzidos a partir de massas com pHs de 5,2, 5,6, 6,0, 6,4, 6,8.....56
- Figura 2.3.** Microscopia eletrônica de varredura dos requeijões fabricados a partir de pH 5,2 (1), 5,6 (2), 6,4 (3) e 6,8 (4). Os espaços vazios indicam a presença de partículas de gordura no queijo original. Bar = 3 μm61
- Figura 3.4.** Características visuais dos requeijões fabricados a partir de diferentes pHs (cada pH é indicado na figura correspondente).....63

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 2.1 Composição química média \pm DP (n=2) dos requeijões fabricados a partir de diferentes pHs após 10 dias de armazenamento refrigerado.....	54
Tabela 2.2. Graus de Liberdade e probabilidades para os diferentes pHs dos queijos durante o tempo de estocagem.....	58
Tabela 2.3. Valores médios (n=4) dos parâmetros de textura para as amostras de requeijão cremoso fabricados a partir de diferentes pHs após 1 dia de fabricação e armazenamento refrigerado.....	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. REQUEIJÃO CREMOSO	15
1.2. TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DE REQUEIJÃO CREMOSO.....	15
1.3. SAIS EMULSIFICANTES	18
1.4. EFEITOS DO PH SOBRE A ESTRUTURA DO REQUEIJÃO CREMOSO	21
1.5. EFEITO DO PH NA HIDRÓLISE DOS POLIFOSFATOS DE SÓDIO	23
1.6. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	25
CAPÍTULO I	26
RESUMO.....	27
1.1. INTRODUÇÃO	28
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1.3.1 Atribuição dos sinais no espectro	32
1.3.2. Composição e Hidrólise dos Polifosfatos em Água, Leite e Caseinato de Cálcio.....	33
1.4. CONCLUSÃO.....	36
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II	39
RESUMO.....	40
2.1. INTRODUÇÃO	41
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.3.4. Efeito do pH Sobre a Textura e Estrutura do Requeijão Cremoso.....	51
2.4. CONCLUSÃO.....	57
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
DISCUSSÃO GERAL	62
CONCLUSÃO GERAL	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO GERAL

O requeijão é um tipo de queijo processado ou fundido tipicamente brasileiro. O produto ocupa, hoje, o segundo lugar entre os tipos de queijos mais consumidos no país, ficando atrás somente da muçarela. É produzido pela fusão sob aquecimento e agitação de uma massa fresca, obtida por coagulação ácida a quente ou enzimática, que diferem entre si, principalmente, pelo pH. (BRASIL, 1997; ABIQ, 2011).

Massas obtidas por coagulação ácida a quente apresentam pH em torno de 5,4 a 5,6, enquanto que massas coaguladas enzimaticamente possuem pH próximo ao encontrado no leite (6,7-6,8) (VAN DENDER; GALLINA & ZACARCHENCO, 2014).

Industrialmente, sais emulsificantes à base de polifosfatos de sódio são utilizados no processo de fusão dos queijos. Quando adicionados à massa, os sais promovem uma complexação do cálcio ligado à caseína, resultando na sua dissociação (peptização), além de atuar como tampão, ajustando o pH do queijo processado. Estas ações estão intimamente relacionadas ao tipo e tamanho de cadeia dos polifosfatos (MUSLOW et al., 2007).

No processo de formação do requeijão, a substituição do cálcio pelo sódio (promovida pelos sais de sódio) permite que a caseína atue como emulsificante, além de aumentar a sua capacidade de imobilização de água. Com a aplicação de calor, a reassociação das caseínas (cremificação) leva a um aumento rápido da viscosidade do sistema. Durante o resfriamento a viscosidade se mantém, sugerindo que outras forças, que não hidrofóbicas, estejam atuando na nova formação do gel (pontes de cálcio e ligações de hidrogênio) juntamente com a possível imobilização da água na estrutura (GUINEE et al., 2004, LUCEY, 2008).

Estudos mostram que os polifosfatos podem sofrer hidrólise quando submetidos a altas temperaturas e variações de pH (MC BEATH, 2007; RULLIERE, 2012) mas pouco se sabe sobre o seu comportamento durante o processamento e armazenamento em matrizes mais complexas, como o leite, soluções proteicas concentradas e o próprio requeijão. A ocorrência de hidrólise pode levar a uma mudança tanto no mecanismo de ação dos sais, como no pH final do produto, o que

poderia levar a modificações nos parâmetros de textura e estrutura do requeijão cremoso.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{31}P tem auxiliado na elucidação da estrutura e tamanho da cadeia de polifosfatos, através dos deslocamentos químicos obtidos nos espectros. A análise por RMN de ^{31}P é rápida e não necessita de preparo de amostra, evitando modificações na estrutura a ser analisada (SHINTU, CALDARELLI & FRANKE, 2007; RULLIERE et al., 2012).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram; (a) avaliar a influência do pH sobre a hidrólise de polifosfatos em solução aquosa, leite e solução de caseinato de cálcio, e (b) avaliar o impacto do pH na hidrólise dos polifosfatos de sódio na fabricação de requeijão cremoso obtido a partir de ingredientes anidros e as possíveis consequências no perfil de textura e na microestrutura dos queijos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Requeijão Cremoso

O requeijão é um tipo de queijo processado ou fundido que se caracteriza como um produto tradicionalmente brasileiro, de origem artesanal. Ao contrário de outros queijos fundidos, fabricados a partir de vários tipos de queijos ou com queijos de diferentes graus de maturação, o requeijão cremoso é obtido a partir de uma fresca. Segundo a legislação, ele é definido como 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 e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. O produto poderá ser adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias”. Só poderão ser denominados como requeijão aqueles produtos que contenham apenas proteína e/ou gordura de origem láctea (BRASIL, 1997).

O requeijão cremoso deve apresentar a seguinte composição: 38 a 40% de extrato seco, 60% a 62% de gordura no extrato seco, 60 a 66% de nitrogênio total, 1,0 a 1,5% de cloreto de sódio e pH entre 5,2 a 5,7 (VAN DENDER; GALLINA & ZACARCHENCO, 2014).

No Brasil existem vários tipos de requeijões que diferem entre si nos teores de umidade e gordura, resultando em produtos fluidos com propriedades de espalhabilidade (requeijão cremoso) até produtos passíveis de serem fatiados (requeijão mineiro e requeijão do norte), sendo o primeiro o mais comumente industrializado (OLIVEIRA, 1986). A produção anual de requeijão cremoso chega hoje a 230000 toneladas, o que o coloca em segundo lugar na lista dos queijos mais produzidos no país, correspondendo a 27% da produção nacional (ABIQ, 2011).

1.2. Tecnologia de Fabricação de Requeijão Cremoso

O requeijão cremoso é obtido pela mistura de uma massa fresca com os sais emulsificantes e a água sob influência da temperatura e agitação. O produto ainda pode ou não ter adição de gordura, sal ou outros ingredientes. Após a fusão e cozimento, o requeijão é resfriado e embalado (LEE & ANEMA, 2009). Os constituintes da mistura e as condições de processamento são selecionados para se

conseguir a estrutura desejada, assim como a cor, o sabor, a aparência e a vida de prateleira adequada (SCHÄR & BOSSET, 2002). Esta mistura forma um complexo sistema onde proteínas, gordura e sais interagem entre si para formação de uma rede tridimensional em um meio aquoso.

Na fabricação industrial de requeijão cremoso, a obtenção da massa pode ser feita, através de três processos: o tradicional (fermentação por bactérias lácticas); por acidificação direta a quente; e por coagulação enzimática. As massas obtidas em cada caso apresentam características diferentes, o que irá influenciar as etapas posteriores do processamento (FERNANDES & MARTINS, 1980).

No processo tradicional, as caseínas precipitam quando atingem o ponto isoelétrico das micelas de caseína (pH 4,6), e a massa obtida encontra-se completamente desmineralizada. Para que se possa obter uma fusão adequada deste tipo de massa, é necessário que haja uma recuperação do equilíbrio salino entre o cálcio e o caseinato, o que pode ser feito através da lavagem da massa com água e posteriormente com leite (OLIVEIRA, 1986).

Na coagulação enzimática, a massa é formada através a ação do coalho (renina) e é constituída de paracaseinato de cálcio, encontrando-se altamente mineralizada e com pH muito semelhante ao encontrado no leite (6,7-6,8). Para que o coágulo enzimático possa fundir adequadamente é necessária a utilização de sais emulsificantes capazes de seqüestrar o cálcio bivalente, tornando o paracaseinato mais solúvel (Berger et al., 1989).

Uma massa, quando submetida ao processo de acidificação direta a quente, apresenta uma elevação do ponto isoelétrico das caseínas devido à ação conjunta do calor e do ácido. Assim, a precipitação ocorre em um pH maior que 4,6, geralmente entre 5,3 a 5,5, que é o pH ótimo para que ocorra uma fusão homogênea (Fernandes, 1981a; Berger et al., 1989; Alais, 1970). Desse modo, forma-se um coágulo com características intermediárias entre o coágulo ácido e o enzimático.

No processo de fabricação de queijos fundidos, o pH da massa, ou seja, o tipo de massa a ser escolhida é um fator fundamental, pois determina a consistência do produto final (FERNANDES, 1981).

Após a obtenção da massa, o processo de fabricação do requeijão segue etapas: mistura dos ingredientes; fusão a frio; aplicação de aquecimento sob

agitação constante (cozimento); envase e resfriamento. Durante o estágio inicial de aquecimento, conhecido como fusão, as caseínas são dispersas em pequenas unidades de proteína devido à ação dos sais emulsificantes, processo que é auxiliado pela ação mecânica da máquina de cozimento.

As unidades de proteínas que formam as micelas de caseína são mantidas em suspensão por ligações cálcio-fosfato, mais especificamente ligações de fosfato de cálcio coloidal (DALGLEISH, 2011). O aquecimento inicial brando e agitação, juntamente com a ação dos sais emulsificantes, promovem o sequestro do cálcio e reações de troca iônica, o que permite a dissociação e aumento da hidratação das proteínas. Esta abertura da estrutura faz com que as caseínas adquiram propriedades adequadas para atuar como agentes emulsificantes (GUINEE, 2004).

A estrutura desenvolvida devido à formação de enlaçamentos moleculares das cadeias de proteína possivelmente contribui para o aumento inicial na viscosidade do produto.

O aquecimento (90°C - 100°C) permite uma mudança na conformação das caseínas para que assumam estruturas intermediárias cruciais para as interações proteína-proteína. Entre outras interações, agrupamentos intermoleculares destas estruturas intermediárias (através da exposição de grupos não polares) levam uma a reassociação das unidades de proteína, que se reflete num aumento da viscosidade. O conjunto de reações que ocorrem durante o cozimento é conhecido como cremificação. Através da exposição dos seus grupos polares e apolares, a caseína consegue se ligar à água e à gordura durante a agitação e aquecimento, com formação um gel durante o resfriamento (LEE et al., 2003).

Heertje (2003) e Lee et. al. (2004), através de estudos realizados com queijos processados com e sem gordura, respectivamente, mostraram que a reação de cremificação é essencialmente uma reação básica de proteínas, não necessitando da presença de gordura para ocorrer. A cremificação é, provavelmente, a condição mais importante para fabricação do requeijão e, variações em um ou mais parâmetros como pH, força iônica e o tipo de sal emulsificante podem levar a mudanças significativas nas interações proteína-proteína e proteína-solvente, que se refletem em alterações na textura e

propriedades funcionais dos queijos processados (SHIRASHOJI, 2006). A gordura diminui consideravelmente a viscosidade do produto e afeta de modo favorável a sua consistência final, tornando-o mais macio. Além disso, a gordura confere atributos sensoriais característicos, que, dificilmente conseguem ser mimetizados por outros agentes (MEYER, 1973; FERNANDES, 1981).

A água exerce também um papel fundamental na elaboração de queijos fundidos, pois auxilia a transferência de energia térmica e mecânica durante a formação do sol de caseinato e atua como solvente e dispersante da mistura (VAN DENDER; GALLINA & ZACARCHENCO, 2014).

A textura e as propriedades funcionais do requeijão são determinadas principalmente pelas interações entre as micelas de caseína. A aplicação dos princípios que governam essas interações pode ser útil para entender muitas das propriedades químicas e físicas dos queijos. (LUCEY, JOHNSON e HORNE, 2003).

1.3. Sais emulsificantes

Entre os ingredientes mais importantes utilizados na fabricação de queijos processados estão os sais emulsificantes, que, dependendo de sua natureza química, são adicionados em quantidades que podem variar de 1 a 3 g/ 100 g de produto (MUSLOW, 2007).

Os sais emulsificantes mais utilizados no processo de fabricação do requeijão cremoso são à base de citratos e fosfatos de sódio, utilizados, geralmente em misturas de proporções variáveis de acordo com as características da massa (OLIVEIRA, 1986).

Entre os fosfatos, os ortofosfatos (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4), os polifosfatos de cadeia curta (pirofosfato tetrassódico, tripolifosfato pentassódico) e os polifosfatos de cadeia mais longa ($n > 3$ átomos de fósforo) são os mais empregados (MAURER-ROTHMANN & SCHEURER, 2005). Na indústria alimentícia, misturas de polifosfatos de cadeia linear ou cíclica, contendo um número variável de átomos de fósforo são utilizadas na formação da rede homogênea do requeijão (RULLIERE et al., 2012).

A Figura 1 mostra a estrutura dos polifosfatos mais utilizados na fabricação de queijos processados.

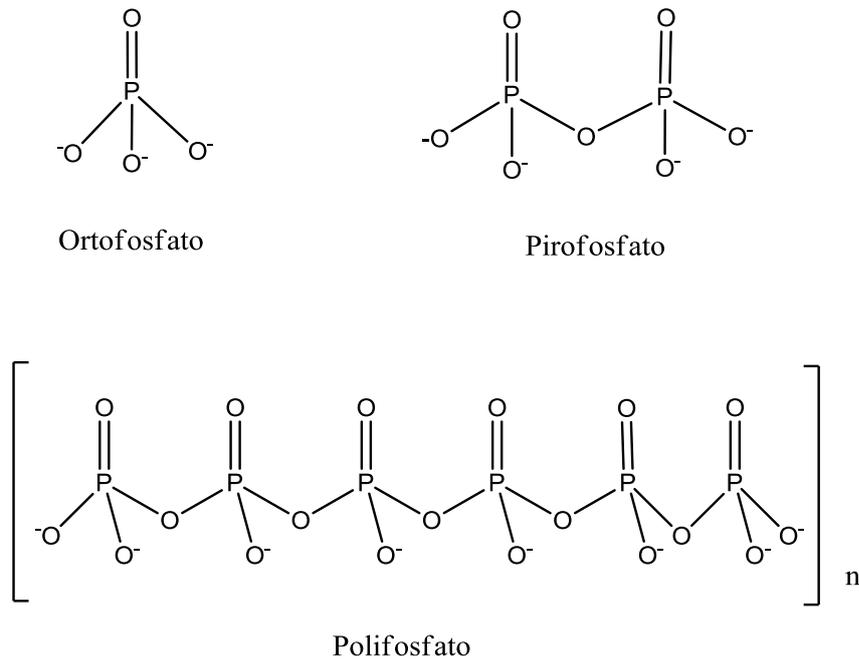


Figura 1. Estrutura química do ortofosfato, pirofosfato e de um polifosfato com n átomos de fósforo na cadeia (onde n pode variar de 3 até mais 200).

Em combinação com a ação do calor e o cisalhamento, os sais de fosfatos convertem a para-caseína insolúvel em paracaseinato de sódio que possui maior capacidade de ligar água. O paracaseinato emulsifica as gotículas de óleo livre e contribui para a formação de uma emulsão óleo em água estável (GUINEE, 2004).

Os polifosfatos possuem grande importância na produção de queijos processados devido a sua ação de complementar a capacidade de emulsificação das caseínas. A função mais importante dos sais emulsificantes é o sequestro de cálcio. Os sais agem rompendo as pontes intra e intermoleculares de cálcio das micelas de caseína, trocando os íons cálcio por sódio. A troca de íons divalentes por monovalentes leva a abertura da estrutura proteica e exposição de grupos hidrofílicos capazes de ligar água livre, promovendo hidratação, inchamento, solubilização e dispersão da caseína (AWAD, 2002). Como consequência, o caseinato solubilizado é capaz de interagir com as interfaces de água e óleo na massa de queijo processado (MUSLOW, 2007). O uso de sal emulsificante, como os polifosfatos de sódio, aumenta a repulsão eletrostática através da exposição de

resíduos de fosfoserina e diminui as interações hidrofóbicas devido a um menor número de ligações cruzadas (JOHNSON & LUCEY, 2006). A dispersão coloidal estável formada pela transformação da caseína insolúvel em caseinato de sódio solúvel causa aumento na viscosidade do sistema, responsável pela mudança na textura dos queijos fundidos. (GUINEE et al., 2004).

Em queijos produzidos a partir de ingredientes anidros, os sais emulsificantes são geralmente adicionados com intuito de hidratar a rede proteica e melhorar a capacidade de emulsificação da gordura. Em queijos processados, a gordura encontra-se completamente emulsificada (LUCEY, 2008). A Figura 2 mostra o mecanismo de atuação do sal emulsificante.

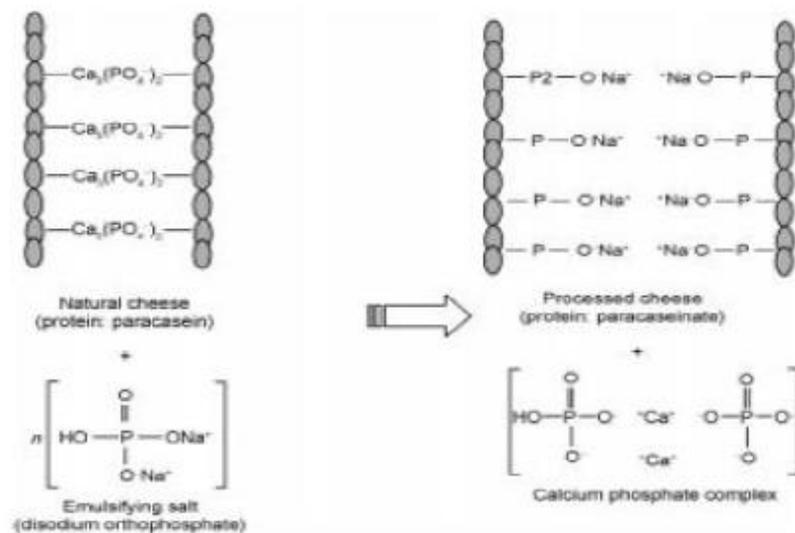


Figura 2. Mecanismo de ação do sal emulsificante (FONTE: GUINEE, 2007).

Entre os fosfatos utilizados na fabricação de queijos processados, os ortofosfatos são considerados agentes complexantes pobres para o cálcio, quando comparados ao pirofosfato e aos polifosfatos de cadeia mais longa (DIMITRELLI et. al, 2005; MIZUNO & LUCEY, 2005). Por outro lado, os ortofosfatos possuem boa capacidade tampão. Essa capacidade de tamponamento dos fosfatos depende do comprimento da cadeia: mono- e difosfatos têm alto poder tamponante, sendo assim capazes de atuar como agentes de correção de pH (SCHAR & BOSSET, 2002; GUINEE et al., 2004). Já os polifosfatos de cadeia longa possuem baixo poder de tamponamento e alta capacidade de sequestro dos íons cálcio e são adicionados com o intuito de aumentar a dispersão das moléculas de caseína (SCHAR &

BOSSET, 2002, 2002; MIZUNO & LUCEY, 2005). Misturas de sais de polifosfatos, utilizadas comercialmente, são compostas de oligofosfatos (ortofosfatos e pirofosfatos) e polifosfatos de cadeia longa com a finalidade de promover um bom balanço entre o sequestro do cálcio e as propriedades tamponantes (SCHAR & BOSSET, 2002;. GUINEE et al., 2004).

As propriedades funcionais, de textura e microestrutura dos requeijões dependem tanto da natureza do sal emulsificante e do grau de polimerização das cadeias dos polifosfatos quanto das características físico-químicas do sistema, como temperatura, pH e força iônica. (MCBEATH et al. 2007; MIZUNO e LUCEY, 2005).

Chen & Liu (2012) estudaram queijo processado tipo mussarela e constataram que os queijos fabricados com citrato trissódico e pirofosfato tetrassódico apresentaram dureza semelhante e maior, respectivamente, quando comparados com queijos produzidos com hexametáfosfato de sódio e ortofosfato dissódico.

1.4. Efeitos do pH sobre a estrutura do Requeijão Cremoso

O pH é um parâmetro importante que influencia várias propriedades dos queijos processados, em especial a textura, a reologia e a microestrutura. A influência do pH se deve, principalmente, aos seus efeitos sobre as interações proteína-proteína e sobre a hidratação da caseína, assim como os efeitos sobre o sequestro do cálcio pelos sais emulsificantes. O aumento ou diminuição do pH do produto levam a formação de queijos que apresentam texturas variando de secas e quebradiças até extremamente macias. Um pH baixo (4,8-5,2) geralmente produz queijos com estrutura seca, firme e granular, com alta suscetibilidade à separação de fase. Já em pH alto (> 6,0), o queijo processado apresenta-se muito macio e úmido (MARCHESSAU et al, 1997;. AWAD et al, 2002). A extensão da mudança do pH depende da capacidade de tamponamento das proteínas do queijo processado, do pH da solução de sal emulsificante e da capacidade tampão da mistura de sais emulsificantes empregada (FOX et al., 2000).

O poder tamponante dos sais de polifosfatos está diretamente relacionado ao tamanho da cadeia. Em geral, quanto menor o tamanho da cadeia, maior a capacidade tamponante do sal. Isso tem levado os fabricantes de sais a incluir

ortofosfatos/difosfatos nas misturas comercializadas para requeijão com a função de corretores de pH (SÁDLÍKOVÁ et al., 2010; WEISEROVÁ et al., 2011; BUNKAN et al., 2012; NAGYOVÁ et al., 2014).

Lucey et al. (2008) estudaram o efeito do pH sobre características de textura e as propriedades funcionais de queijos processados pasteurizados. Para isso, utilizaram sais emulsificantes com diferentes tamanhos de cadeia (citrato trissódico, fosfato dissódico, pirofosfato tetrassódico e hexametáfosfato de sódio). Os autores concluíram que o comportamento funcional do queijo, dependente do pH, foi fortemente influenciado pelo tipo de sal emulsificante e suas propriedades físico-químicas, incluindo a sua capacidade de ligar Ca, a possível criação de ligações cruzadas com caseína e a dispersão de caseína durante o cozimento.

Hannon et al. (2006) usando leite ultrafiltrado, mostrou que o pH do leite utilizado no processo de coagulação pode alterar a microestrutura final de queijos. Queijos produzidos com alto valor de pH (6,6) apresentam uma estrutura proteica densa com os glóbulos de gordura de diferentes tamanhos.

O efeito da diminuição do pH é caracterizado, principalmente, por diminuição da repulsão eletrostática entre as micelas e alteração da distribuição de cálcio entre as micelas e o soro (ZOON, VAN VLIET E WALSTRA, 1989).

Amostras de *cream cheese* ajustadas para pHs ácidos (4.0-4.9) apresentaram uma estrutura com contato limitado entre a rede proteica e a fase gordurosa. A diminuição do pH reduz a repulsão eletrostática e aumenta as interações proteína-proteína, resultando em uma estrutura proteica com volume reduzido, o que leva a uma estrutura de queijo compacta com diminuição do contato entre os glóbulos de gordura e a rede proteica (MONTEIRO, TAVARES, KINDSTEDT E GIGANTE, 2009).

Lee & Klostermeyer (2004) estudaram o efeito do pH nas propriedades mecânicas de queijos processados modelo e mostraram que a dureza e a viscosidade diminuíram com o aumento do pH (de 5,0 para 6,0), confirmando que queijos processados apresentam natureza mais líquida com o aumento do pH.

A textura e características funcionais dos requeijões podem ser manipuladas a partir da composição e das propriedades de seus ingredientes (LEE & ANEMA, 2009). Nesse contexto, o uso de ingredientes anidros visa facilitar o

estudo das variáveis de processo, tais como o pH, pois permite tratar os queijos como sistemas modelo, onde as variáveis são limitadas e bem conhecidas.

1.5. Efeito do pH na Hidrólise dos Polifosfatos de Sódio

Os polifosfatos são produzidos a partir de moléculas de ortofosfato. Este processo, por ser realizado em meio aquoso, resulta em algum nível de hidrólise. Assim, os sais comerciais são compostos de misturas de polifosfatos com diferentes tamanhos de cadeia (LAMPILA & GODBER, 2001).

A hidrólise dos fosfatos vem ganhando crescente atenção em sistemas alimentícios por implicar em possível perda das propriedades funcionais dos fosfatos (MOLINS, 1991). Em geral, as ligações entre grupos fosfatos (PO_4^-) em polifosfatos lineares tendem a ser estáveis em soluções a 25°C e em pHs próximos da neutralidade. Dessa forma, uma solução aquosa de polifosfatos tende a ter aproximadamente a mesma composição da sua forma cristalina. Embora os fosfatos lineares sejam relativamente estáveis em soluções alcalinas ou neutras, com o aumento da temperatura e diminuição do pH do meio, a hidrólise pode ser acelerada levando a formação de ortofosfatos e polifosfatos com tamanho de cadeia menor (McBEATH, 2007). Rulliere et al. (2012) demonstraram, através de análises de ressonância magnética nuclear de ^{31}P , que a hidrólise de polifosfatos em soluções aquosas ocorre a pH ácido e temperaturas iguais ou superiores a 100 °C, e que a presença de cálcio aumenta a taxa de hidrólise dos polifosfatos de cadeia longa com formação principalmente de ortofosfato e pirofosfato como produtos finais.

Em soluções ácidas, a protonação do oxigênio da dupla ligação na unidade de fosfato terminal, ativa o polifosfato para o ataque nucleofílico da água. A via em que as unidades de fosfato terminal são ativadas por protonação tem uma energia de ativação menor (57 kJ/mol) em comparação com a via não catalisada (104 kJ/mol), ou seja, em soluções neutras. Com a diminuição da energia de ativação, a taxa de hidrólise é favorecida. (JAGER & HEYNS, 1998).

Como resultado da hidrólise, a quebra das cadeias de polifosfatos é acompanhada por uma contínua formação de ortofosfatos, que é o produto final da degradação hidrolítica. Assim, o pirofosfato é clivado em dois ortofosfatos. O

tripolifosfato, por sua vez, resulta na formação de um íon pirofosfato e um ortofosfato, seguindo pela quebra do pirofosfato em dois ortofosfatos (MOLINS, 1991). Greenfield & Clift (1975) determinaram os efeitos da temperatura e pH na taxa de formação do íon ortofosfato para diferentes fosfatos utilizados na fabricação de alimentos, mas, os dados publicados por eles foram obtidos em soluções puras em várias temperaturas (57°C, 75°C e 100°C) e com valores de pH de 9.3 a 13.4, consideravelmente maiores que aqueles usados em alimentos.

Dessa forma, fica claro que a adição de polifosfatos em soluções altamente ácidas ou soluções que passarão por processo de tratamento térmico irão resultar em misturas de fosfatos com perfil de tamanho de cadeia diferente da inicial.

Além da temperatura e do pH a presença de cátions metálicos, particularmente os altamente carregados também pode catalisar a quebra hidrolítica dos fosfatos. Isso ocorre devido ao efeito quelante do oxigênio dos polifosfatos sobre os cátions, que resulta numa maior suscetibilidade do átomo de fósforo ao ataque nucleofílico. Íons cálcio e magnésio catalisam a hidrólise de polifosfatos, especialmente em soluções alcalinas (MOLINS, 1991).

Embora os estudos apontem a ocorrência de hidrólise dos polifosfatos sob condições semelhantes às do processamento do requeijão, a maioria deles utiliza soluções aquosas ou soluções aquosas adicionadas de íons como meio para tais reações. Pouco se sabe sobre as reações de hidrólise em sistemas mais complexos, como soluções proteicas ou o leite e, como variações nos parâmetros de processo, como o pH, podem influenciar no grau de hidrólise e no tipo de fosfatos formados a partir dessa reação.

O grau de hidrólise dos polifosfatos pode ter grande impacto sobre a textura e as propriedades funcionais dos queijos. Quando se utiliza fosfatos individualmente, a dureza das amostras de queijos processados diminui na seguinte ordem: polifosfato > trifosfato > difosfato > monofosfato. Em misturas de mono, di e trifosfatos com os polifosfatos, a dureza das amostras aumenta com o aumento da proporção de polifosfato na mistura (WEISEROVÁ et al., 2011; DIMITRELI & THOMAREIS, 2009; SÁDLÍKOVÁ et al., 2010).

A possível ocorrência de hidrólise dos fosfatos durante as etapas de processamento pode levar a uma mudança na proporção do tamanho das cadeias

de fosfatos adicionados inicialmente, afetando assim, o pH final do produto, o que pode explicar as alterações na textura e funcionalidade do requeijão e queijos fundidos. Qualquer alteração do pH durante o processo de fusão dos queijos afeta as suas propriedades funcionais (LU; SHIRASHOJI; LUCEY, 2008). Um maior entendimento sobre o impacto do pH na hidrólise dos polifosfatos e nas propriedades de textura na fabricação de queijos processados é útil para compreender as diferentes interações na matriz proteica e como essas interações determinam as propriedades funcionais do requeijão.

1.6. Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta útil de caracterização estrutural de componentes dos alimentos em solução ou no estado sólido (YAN et al, 1996). A análise de RMN de ^{31}P é um método não invasivo e não destrutivo. Estudos utilizando RMN de ^{31}P são capazes de detectar espécies naturais de fosfatos em alimentos (ATP, PCr e Pi) e de moléculas adicionadas, como polifosfatos de sódio. A análise de RMN de ^{31}P tem sido usada para caracterização de misturas de polifosfatos utilizados para tratamento de água e em materiais cerâmicos (CASAS et al., 2009), como também na área de alimentos, principalmente no que diz respeito aos queijos processados (RULLIERE et al., 2012). O uso da técnica de RMN de ^{31}P possui vantagens quando utilizada em análise de alimentos como: (1) é uma técnica rápida; (2) não necessita preparo de amostra, de modo que esta permanece intacta, diminuindo perdas e minimizando erros; (3) por ser o fósforo um núcleo 100% abundante, a análise de RM de ^{31}P se torna muito precisa; (4) em um mesmo espectro é possível a caracterização de diferentes compostos fosforilados.

Além da caracterização, a análise de RMN de ^{31}P permite, através da integração e normalização dos picos presentes no espectro, a quantificação proporcional das espécies de fosfatos presentes nas amostras. Dessa forma, esta técnica possui sensibilidade suficiente para detectar e quantificar diferentes espécies de polifosfatos adicionados aos alimentos (MONIN, 1998).

CAPÍTULO I

EFEITO DO pH NA HIDRÓLISE DE POLIFOSFATOS EM MATRIZES LÁCTEAS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ³¹P

Ana Paula Barth, Walkiria Hanada Viotto, Cláudio Francisco Tormena

*Este trabalho será submetido à publicação na revista "Journal of
Dairy Science"*

RESUMO

Sais de polifosfatos de sódio são utilizados como agentes quelantes de íons em diversos segmentos industriais. Na indústria de alimentos, especialmente a de produtos lácteos, os polifosfatos são utilizados para sequestrar íons Ca^{2+} , e a sua função depende do número de átomos de fósforos presentes na cadeia dos fosfatos. Reações de hidrólise dos polifosfatos podem ocorrer em função do Ph e do ambiente químico em que estão inseridos, podendo resultar em perda da função a que o polifosfato foi destinado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Ph (5.2, 5.6, 6.0, 6.4, 6.8), em solução aquosa, leite e solução de caseinato de cálcio, na hidrólise de um sal de polifosfato comercial comumente utilizado na fabricação de requeijão cremoso, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{31}P . Em água, a taxa de hidrólise aumentou à medida que o Ph diminuiu. Em leite, manteve-se a tendência observada nas soluções aquosas, porém a porcentagem absoluta de hidrólise em todos os pHs foi maior quando comparada com a água, possivelmente devido a presença de íons cálcio. Em caseinato de cálcio, a taxa de hidrólise apresentou a mesma tendência encontrada na água e leite, exceto pra o Ph 5.2, onde a taxa de hidrólise diminuiu em relação aquela observada em leite. Apesar da maior concentração de cálcio e do baixo valor de Ph, a menor taxa de hidrólise dos polifosfatos em solução de caseinato provavelmente ocorreu devido à menor mobilidade das partículas nessa matriz, uma vez que a estrutura proteica encontrava-se mais compacta. Estes resultados revelam a importância do controle do pH quando sais de polifosfatos de sódio são utilizados na fabricação de queijos processados.

Palavras chave: RMN de ^{31}P ; hidrólise; polifosfatos de sódio; matrizes lácteas.

1.1. INTRODUÇÃO

Os polifosfatos de sódio são poliânions utilizados como ingredientes indispensáveis na produção de queijos processados ou fundidos. Os sais de fosfatos de sódio convertem a para-caseína insolúvel em paracaseinato de sódio sob ação do calor e cisalhamento. O paracaseinato de sódio emulsifica as gotículas de óleo livre e aumenta a capacidade da paracaseína de ligar água, contribuindo assim para a formação de uma emulsão óleo em água estável (Guinee, 2004; Mizuno e Lucey, 2005).

Os sais de polifosfato são produzidos por condensação de inúmeras unidades de ortofosfatos (HPO_4^-) que resultam na formação de polifosfatos com diferentes tamanhos de cadeias. Devido ao processo de obtenção, fatores como pH e temperatura podem levar a ocorrência de hidrólise das cadeias e, assim, a uma mudança na proporção de cada espécie de polifosfato presente (McBeath et al., 2007).

A hidrólise de fosfatos em alimentos, especialmente em queijos processados, vem ganhando atenção, pois implica em possível perda da sua função sequestrante de íons (principalmente o Ca^{+2}), o que pode resultar em produtos com características diferentes das esperadas (Molins, 1991). Em soluções neutras, a hidrólise ocorre de forma muito lenta, mesmo em temperaturas de 100°C (Halliwell et al., 2001; Torres-Dorante et al., 2005). A diminuição do pH aumenta a concentração de íons H^+ em solução, um potente catalisador das reações de hidrólise. A energia de ativação para a hidrólise das ligações P-O-P em soluções neutras é maior que 104 kJ/mol , já em soluções ácidas, a energia de ativação requerida é de apenas 57 kJ/mol . A hidrólise acontece, principalmente, no grupo fosfato terminal após a protonação da dupla ligação do oxigênio, dando origem a ortofosfatos como produto final de reação. Isso ocorre, porque a transferência de prótons é facilitada nas unidades de fosfato terminal devido à presença de quatro grupos OH, ao invés de dois em unidades de fosfato não terminal (Jager e Heyns, 1998).

Estudos realizados evidenciam que a hidrólise dos polifosfatos pode ocorrer em condições semelhantes às do processamento de queijos fundidos, como o requeijão (McBeath et al., 2007; Rulliere et al., 2012). Entretanto, a maioria desses

estudos utilizam água ou soluções aquosas como meio para tais reações. Pouco se sabe sobre as reações de hidrólise em sistemas mais complexos, como em soluções proteicas (leite, caseinatos) e, como variações nos parâmetros de processo, como o pH, podem influenciar no grau de hidrólise e no tipo de fosfatos formados a partir dessa reação. Os queijos usados como matéria prima para a fusão apresentam normalmente pH na faixa de 5,2 a 6,5, dependendo do tipo de coagulação a que foram submetidos.

A espectroscopia de RMN de ^{31}P tem sido utilizada para avaliar a quantidade de átomos de fósforo presente em cadeias de polifosfatos (Casas et al., 2009; Rulliere et al., 2012b). O uso desta técnica traz vantagens, como rapidez, precisão e facilidade de análise. Além disso, o preparo de amostra é simples e em um mesmo espectro é possível a detecção e quantificação de diferentes compostos fosforilados, através da integração das áreas dos picos correspondentes.

O objetivo desse trabalho foi avaliar efeito de diferentes pHs (5,2, 5,6, 6,0, 6,4, 6,8) sobre a hidrólise de um sal a base de polifosfatos utilizado comercialmente, em água, leite e caseinato de cálcio.

1.2. MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1. Preparo das soluções

Soluções aquosas de ortofosfato de sódio (Sigma, Missouri, EUA), pirofosfato dissódico (Sigma, Missouri, EUA), pirofosfato tetrassódico (Sigma, Missouri, EUA) e tripolifosfato pentassódico (Sigma, Missouri, EUA) a 10%, foram utilizadas como padrões para atribuição do deslocamento químico dos sinais no espectro do polifosfato comercial.

Para as análises de hidrólise, foram utilizadas soluções de um polifosfato de sódio comercial (Budenheim, Budenheim, Alemanha), normalmente utilizado na fabricação de queijos processados, a 2,3% em água destilada, leite desnatado (Nestlé, São Paulo, Brasil) e caseinato de cálcio (10,5% em proteína) (ALIBRA, Campinas, Brasil).

1.2.2. Preparo das amostras

Para se avaliar o efeito do pH sobre a hidrólise dos polifosfatos, as amostras foram analisadas em pH 5,2, 5,6, 6,0, 6,4 e 6,8. As soluções aquosas foram preparadas dissolvendo-se o sal emulsificante em água destilada a 2,3 % (v/v). O pH das soluções foi ajustado utilizando ácido láctico 85 % (ECIBRA, São Paulo, Brasil) ou NaOH 0,1 M (Dinâmica, São Paulo, Brasil) usando pHmetro Digimed DM22 (São Paulo, Brasil).

As amostras de leite foram preparadas a partir de leite em pó desnatado (NESTLÉ, São Paulo, Brasil), dissolvido em água a 10 % p/v e a 20 °C. Após a dissolução, foi adicionado 2,3 % p/v de polifosfato comercial e amostra permaneceu em agitação até completa dissolução do sal. O pH foi ajustado utilizando-se ácido láctico 85 % (ECIBRA, São Paulo, Brasil) e NaOH 0,1 M (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

As soluções de caseinato (ALIBRA, Campinas, São Paulo) foram preparadas misturando-se o caseinato de cálcio em água destilada até uma concentração final de 10,5 % de proteína. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um *mixer* (MONDIAL, Brasil). Novamente o pH foi ajustado com ácido láctico 85 % e NaOH 0,1 M até os valores previamente mencionados. Após homogeneização e ajuste do pH, a solução de caseinato foi deixada sob refrigeração, por 8 horas, para completa hidratação da proteína. O gel de caseinato de cálcio resultante foi então colocado em um reator IKA LR100 (IKA, Alemanha) sob agitação (3000 RPM). A temperatura do reator foi ajustada para 40 °C, momento em que o sal comercial foi adicionado, e agitação foi mantida por 3 a 5 min. Ao final da agitação, as amostras foram retiradas para análise de RMN de ^{31}P .

1.2.3. Determinação dos Polifosfatos por RMN de ^{31}P

Todos os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro BRUKER Avance III (BRUKER, Alemanha), operando na frequência de 500 MHz para o núcleo de ^1H e na frequência de 202.35 MHz para o núcleo de ^{31}P . O pico de ortofosfato foi utilizado como referência para integração dos sinais. Foram utilizados capilares contendo D_2O para realizar o *lock* (trava de campo) empregando o núcleo de deutério (^2H).

Cada amostra de água, leite e caseinato, após ajuste do pH (5,2, 5,6, 6,0, 6,4 e 6,8), foi colocada em tubos de RMN de vidro com 5 mm de diâmetro. Imediatamente, as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido para evitar qualquer tipo de degradação dos polifosfatos, até o momento das análises. As amostras foram então colocadas no RMN e analisadas a 25 °C, 90 °C e 10 °C, necessariamente nessa ordem. Espectros foram obtidos em cada temperatura. O tempo total de processo foi de 90 minutos. Esse procedimento foi realizado visando mimetizar o processo pelo qual passa a massa durante a produção do requeijão cremoso.

A integração e normalização das áreas dos sinais no espectro de RMN de ^{31}P permite a determinação da composição dos polifosfatos (% dos diferentes tamanhos de cadeia). A porcentagem relativa de cada espécie de fosfato foi calculada a partir da razão entre a integração do pico de cada componente e a área total das espécies do espectro.

A hidrólise acontece principalmente pela quebra dos grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ terminais, com formação de ortofosfatos como produto final de reação. Dessa forma, a diferença entre porcentagem final e inicial das espécies de ortofosfato diz respeito a quantidade relativa de hidrólise dos polifosfatos. O aumento da porcentagem de ortofosfatos em relação a quantidade inicial foi considerado como a taxa de hidrólise ocorrida.

Os espectros unidimensionais (1D) de ^{31}P RMN com desacoplamento de ^1H , foram obtidos com largura espectral (*Spectral Width*) de 21306.8 Hz e tempo de aquisição de 0,3845 s. Para obter as quantidades relativas dos diferentes tipos de polifosfatos na mistura comercial, um tempo de espera entre as aquisições (*delay time*) de 60 s foi utilizado. Para as amostras dos polifosfatos em leite e solução de caseinato de cálcio foi utilizado uma função exponencial para multiplicar o FID com uma largura de linha (lb) de 20 Hz. Em todos os casos, a frequência de referencia foi definida como sendo o pico correspondente ao ortofosfato (P_1), em torno de 1 ppm, dependendo do pH e da temperatura. Os espectros obtidos foram processados com auxílio do software TOPSPIN 3.1® (BRUKER, Alemanha).

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Atribuição dos sinais no espectro

Os sinais no espectro de RMN de ^{31}P do sal de polifosfatos, dependendo do seu deslocamento químico e multiplicidade, podem ser atribuídos a diferentes átomos de fósforo do esqueleto dos polifosfatos que estão presentes na solução.

Uma série de sinais complexos foram identificados em três regiões distintas de deslocamento químico: (1) em torno de 1 ppm (a), (2) entre -5 ppm e -9 ppm (c e b) e (3), entre -21 ppm e -24 ppm (d).

A partir dos espectros obtidos com os padrões de sais puros, tem-se que o singlete em 1.44 ppm ($^{\text{a}}\text{P}$) corresponde ao sinal do ânion ortofosfato (PO_4) $^{3-}$, que é o menor fragmento que se pode obter a partir da quebra das cadeias de polifosfatos durante a hidrólise. O singlete em -7.73 ppm ($^{\text{b}}\text{P}$) corresponde aos dois átomos de fósforo do pirofosfato (P_2O_7) $^{4-}$, devido a sua conformação e estrutura simétrica. Centrado em -7.44 ppm aparece um dublete que corresponde aos átomos de fósforo das posições terminais dos polifosfatos de cadeia longa ($\text{P}>3$), identificados na Figura 1 como $^{\text{c}}\text{P}$. De acordo com Turner et al. (2003), os átomos de fósforo das posições terminais ressonam entre -4 ppm e -10 ppm em função do pH da amostra.

A região do espectro de RMN de ^{31}P entre -21 ppm e -24 ppm (P^{d}) corresponde aos sinais dos átomos de fósforo do interior de diferentes cadeias de polifosfatos, como mostrado por vários autores para polifosfatos em sedimentos de solo e hídricos (Hupfer et al, 2004; Turner et al., 2003). Devido à sobreposição dos sinais, convencionou-se que a região (entre -21.11 ppm e -22.73 ppm) corresponde aos átomos de fósforo pertencentes aos polifosfatos com 3 a 10 átomos de fósforo e esta área foi somada a área do dublete correspondente aos fósforos terminais, para fins de quantificação.

A região do espectro de RMN de ^{31}P entre -21 ppm e -24 ppm (P^{d}) corresponde aos sinais dos átomos de fósforo do interior de diferentes cadeias de polifosfatos, como mostrado por vários autores para polifosfatos em sedimentos de solo e hídricos (Hupfer et al, 2004; Turner et al., 2003). Devido à sobreposição dos sinais, convencionou-se que a região (entre -21.11 ppm e -22.73 ppm) corresponde aos átomos de fósforo pertencentes aos polifosfatos com 3 a 10 átomos de fósforo e

esta área foi somada a área do dublete correspondente aos fósforos terminais, para fins de quantificação.

A Figura 1.1 mostra o espectro de RMN de ^{31}P do polifosfato comercial, 2,3 % em água a 25 °C.

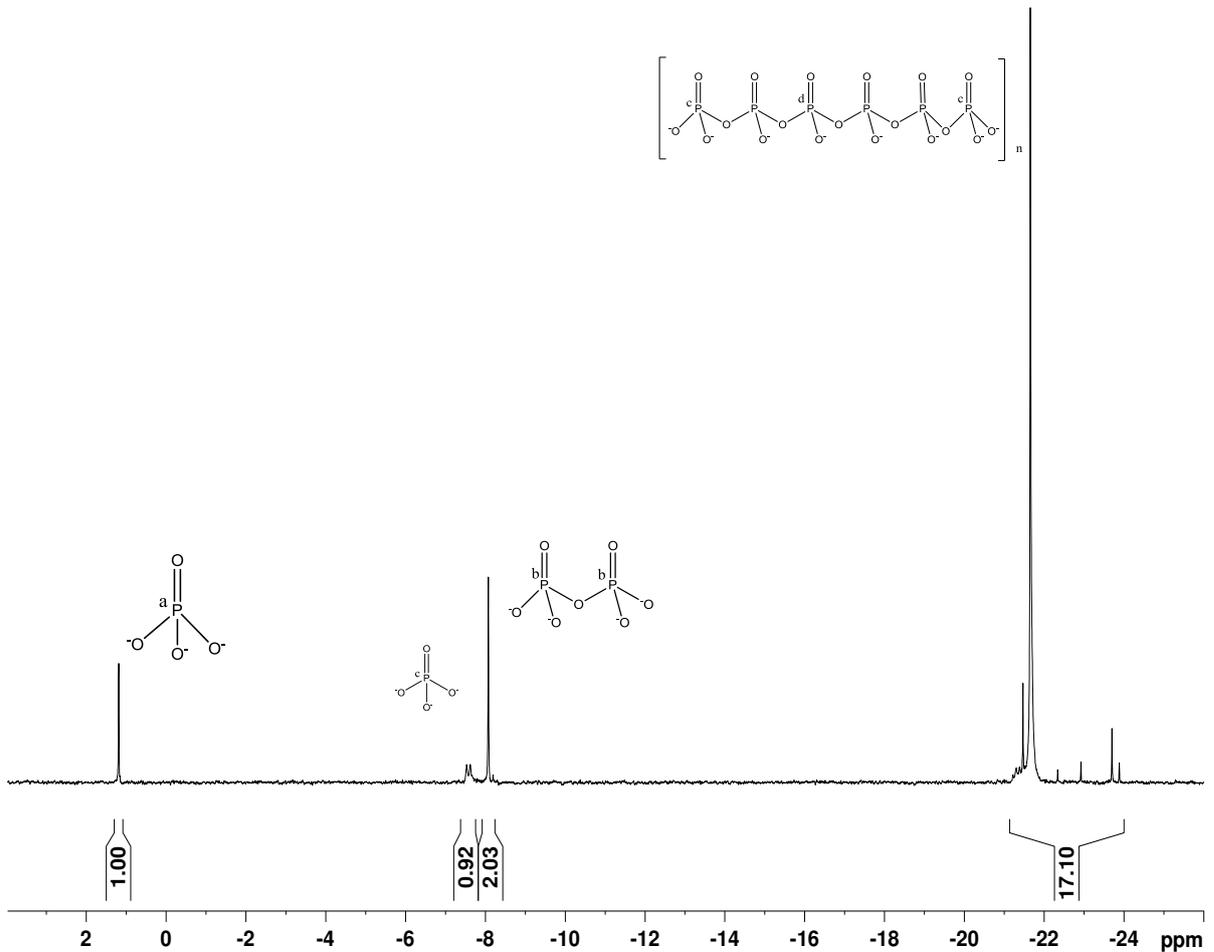


Figura 1.1: Espectro de RMN de ^{31}P do sal de polifosfato comercial em água em pH 6,8 a 25 °C (outros espectros não foram mostrados).

1.3.2. Composição e Hidrólise dos Polifosfatos em Água, Leite e Caseinato de Cálcio

Experimentos em leite, água e caseinato de cálcio, a diferentes pHs, foram executados para verificação da influência do ambiente químico sobre a hidrólise de polifosfatos utilizados comercialmente na produção de requeijão e queijos processados.

A hidrólise de polifosfatos em água foi afetada por mudanças de pH. A hidrólise acontece principalmente pela quebra dos grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ terminais, com formação de ortofosfatos como produto final de reação. Dessa forma, o aumento na porcentagem desta espécie ao final da análise diz respeito à quantidade relativa de hidrólise dos polifosfatos em solução.

A porcentagem de hidrólise dos polifosfatos em água, leite e caseinato de cálcio, ao final de cada processo é apresentada na Figura 1.2

O pH influenciou a hidrólise de polifosfatos nas diferentes matrizes. Em pHs mais ácidos (5,2 e 5,6), a formação de ortofosfatos foi mais acentuada que em pHs próximos da neutralidade (6,0 a 6,8).

Em água, à medida que o pH diminuiu de 6,8 para 5,2 houve um aumento gradual da porcentagem de hidrólise de 4,20 % para 7,59 %, respectivamente. Isso ocorreu devido à protonação dos grupos fosfato terminal das cadeias dos polifosfatos. Antes do polifosfato ser hidrolisado, ele deve estar susceptível ao ataque nucleofílico da água. Em soluções neutras, isto pode ser conseguido pela estrutura de ressonância de uma unidade de fosfato. Em soluções ácidas, a protonação do oxigênio da dupla ligação na unidade de fosfato terminal ativa o polifosfato para o ataque nucleofílico da água. A via em que as unidades de fosfato terminal são ativadas por protonação tem uma energia de ativação menor (57 kJ/mol) em comparação com a via não catalisada (104 kJ/mol), ou seja, em soluções neutras. Com a diminuição da energia de ativação, a taxa de hidrólise aumenta (Jager e Heyns, 1998).

Em leite, o comportamento de hidrólise foi semelhante à água, porém, como mostrado na Figura 2.2, as taxas de hidrólise foram mais elevadas que aquelas encontradas para a água. Rulliere et al.(2012) também observaram aumento da hidrólise de polifosfatos de cadeia curta e cadeia longa em soluções contendo cálcio, quando comparadas a soluções aquosas a 100 °C.

O leite apresenta, em média, 119 mg de cálcio/100g de produto. A presença de cátions metálicos, particularmente os divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), catalisa a hidrólise dos fosfatos. Isso ocorre devido ao efeito quelante do cátion sobre o oxigênio do polifosfato, o que resulta numa maior suscetibilidade do átomo de fósforo ao ataque nucleofílico da água (Molins, 1991).

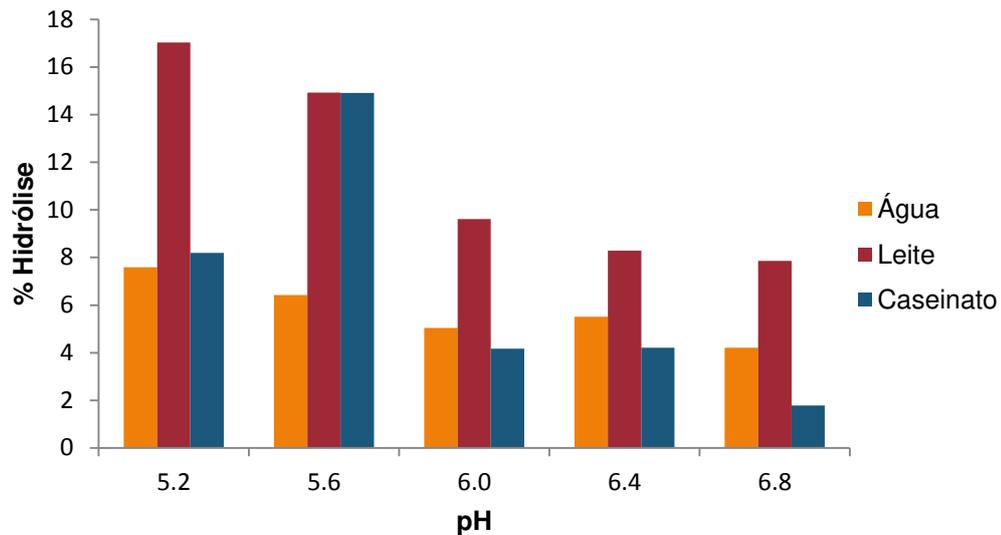


Figura 1.2. Porcentagem de hidrólise dos polifosfatos em água, leite e caseinato de cálcio em diferentes pH.

No leite, a presença de Ca^{2+} juntamente com a diminuição do pH pode ter potencializado a hidrólise dos polifosfatos.

A mistura de polifosfatos e caseinato de cálcio apresentou um comportamento diferente. Nos pHs 5,2, 6,0, 6,4 e 6,8 a hidrólise dos polifosfatos em caseinato foi semelhante a hidrólise ocorrida em água, e conseqüentemente, menor que a hidrólise ocorrida em leite, mesmo que a quantidade de Ca^{2+} no caseinato seja maior (em torno de 195 mg/100g). De acordo com Jager e Heyns (1998), a taxa de hidrólise não depende somente de energia de ativação. Outro fator que interfere na hidrólise dos polifosfatos envolve a colisão entre três diferentes partículas, isto é, o polifosfato, os íons H^+ e as moléculas de água. Em soluções aquosas, as moléculas tem livre movimento e a chance de colisão entre as partículas ocorrer é maior. Já em soluções concentradas de proteínas, como é o caso do caseinato de cálcio (10,5 % em água), as moléculas tem mais dificuldade de se locomover e, portanto, a chance de colisão entre as partículas fica diminuída, o que explica a menor taxa de hidrólise do polifosfato em caseinato de cálcio quando comparada à ocorrida em leite

Em geral, para as soluções de caseinato de cálcio, houve aumento da hidrólise com a diminuição do pH, na faixa de 6,8 a 5,6. Esse comportamento mudou para as amostras de no caseinato a pH 5,2 (Figura 1.2), que apresentaram uma

diminuição da taxa de hidrólise em relação a amostra com pH 5,6. Este resultado pode ser explicado pela estrutura proteica encontrada nestes valores de pH. O pH 5,2 está mais próximo do ponto isoelétrico da caseína, dessa forma, há na quantidade diminuição das cargas negativas e a rede proteica se torna mais compacta (Marchesseau, 1997). A rede proteica mais compacta pode ter impedido a difusão e a conseqüente colisão dos polifosfatos com as moléculas de água, uma vez que também não houve agitação durante a análise de RMN de ^{31}P .

1.4. CONCLUSÃO

A hidrólise dos polifosfatos normalmente utilizados na fabricação de queijos processados aumentou com a diminuição do pH. Os íons H^+ catalisam a reação de hidrólise. A presença de íons Ca^{2+} possui um efeito adicional sobre a hidrólise. O meio em que polifosfatos estão contidos também influencia a taxa de hidrólise. Soluções líquidas permitem livre movimento das moléculas, aumentando assim, a chance de colisão e a quebra de ligações. A ocorrência hidrólise pode alterar as propriedades funcionais de polifosfatos quando utilizados na fabricação de requeijão e queijos processados, podendo assim, modificar as características do produto final.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Casas, J. M., García, M. P., Sanz, M., Cacho, F., Pérez, J. 2010. ^{31}P NMR spectroscopic studies of the influence of the environment in the degradation processo f the Graham's salt. *Ceramics International*,v 36 p.39-46.
- Guinee, T. P., Caríc, M., Kaláb, M. 2004. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In Fox, P. F.; McSweeney, P. L.H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. 2. Major cheese groups 3rd Ed. London: Elsevier Ltd., cap. 21, p. 349-394

- Halliwell, D. J., Mckelvie, I. D., Hart, B. T., Dunhill, R. H. 2001 Hydrolysis of triphosphate from detergents in a rural waste water system. *Water Research*, 35, 448-454.
- Hupfer, M., R B. Rube, and P. Schmieder. 2004. Origin and diagenesis of polyphosphate in lake sediments: a ³¹P NMR study. *Limnology And Oceanography: Methods*. 2004 49:1-10. Q1
- Jager, H., Heyns, A. M. 1998. Kinetics of Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Polyphosphate in Water. *The journal of physical chemistry A*, 102 (17), pp 2838–2841.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A. & CUQ, J.L. 1997. Influence of pH on protein interactions and microstructure of processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 1483–1489.
- McBeath, T.M., Lombi, E., McLaughlin, M. J., Bumann, E. K. 2007. Polyphosphate-fertilizer solution stability with time, temperature, and pH. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 170(3), 387-391.
- Mizuno, R., Lucey, J. A. 2005. Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium-phosphate–protein interactions in casein micelles. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 3070-3078.
- Molins, R.A. 1991. *Phosphates in Food*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Rulliere, C., Perenes, L., Senocq D., Dodi, A., Marchesseau, S. 2012. Heat treatment effect on polyphosphate chain length in aqueous and calcium solutions. *Food Chemistry*. v. 134, p. 712-716.
- Rulliere, C., Rondeau-Mouro, C., Raouch, S., Dufrechou, M.; Marchesseau, S. 2012. Studies of polyphosphate composition and their interaction with dairy matrices by ion chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *International Dairy Journal*, v.28, p. 102-108.
- Torres-Dorante LO., Claassen N., Steingrobe B., Olf HW. 2005. Hydrolysis rates of inorganic polyphosphates in aqueous solution as well as in soils and effects on P availability. *Journal of Plant Nutr Soil Science*, 168:352-358.

Turner, B. L., Mahieu, N., Codron, L. M. 2003. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v67 p. 497–510.

CAPÍTULO II

EFEITO DO pH NA HIDRÓLISE DE POLIFOSFATOS E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE REQUEIJÃO CREMOSO

Ana Paula Barth, Walkiria Hanada Viotto, Cláudio Francisco Tormena

Este trabalho será submetido à publicação na revista "Journal of Dairy Science"

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar efeito do pH da massa (5,2, 5,6, 6,0, 6,4, 6,8) sobre a hidrólise de polifosfatos e o impacto nas propriedades de textura e microestrutura de requeijão cremoso obtido a partir de ingredientes anidros. O monitoramento da hidrólise dos polifosfatos de sódio foi realizado através da técnica de ressonância magnética nuclear de ^{31}P . Os requeijões foram avaliados quanto à composição química, perfil de textura e microscopia eletrônica de varredura. O pH influenciou a taxa de hidrólise dos polifosfatos das diferentes amostras, sendo que os requeijões com pH mais ácidos (5,2 e 5,6) apresentaram maior porcentagem de hidrólise quando comparados a pHs mais elevados (6,0 a 6,8). Essas variações se refletiram nos parâmetros de textura e microestrutura. Os requeijões fabricados a partir de massas com pH 5,2 apresentaram textura mais firme e adesiva. Em consequência disso, a microestrutura desses queijos revelou a presença de grandes agregados proteicos fortemente unidos devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as cadeias de caseína. Já os requeijões fabricados a partir de massas com pHs mais elevados (6,0 e 6,4) apresentaram textura menos firme e adesiva revelando uma rede proteica mais densa, com a gordura e a água mais uniformemente distribuídas. A pH 6,8, o requeijão apresentou uma estrutura formada de pequenos agregados, possivelmente devido a formação de novas interações, que se refletiram em pequeno aumento da firmeza do produto final. Os resultados evidenciaram que pequenas variações no pH, produzem mudanças substanciais na estrutura do produto que se refletirão nas características de qualidade do produto final.

Palavras-chave: requeijão cremoso, pH, perfil de textura, microscopia, hidrólise, RMN de ^{31}P .

2.1. INTRODUÇÃO

O requeijão cremoso é um tipo de queijo processado ou fundido tipicamente brasileiro. É o segundo tipo de queijo mais produzido no país, ficando atrás apenas da muçarela (ABIQ, 2011).

Diferentemente dos queijos processados, fabricados a partir de vários tipos de queijos com diferentes graus de maturação, o requeijão cremoso é obtido através de uma massa fresca. Esta massa pode ser obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite. As massas obtidas em cada caso apresentarão características diferentes, sendo que a principal delas é o pH. Massas obtidas por coagulação ácida a quente ou por ação de bactérias lácticas apresentam pH em torno de 5.2 a 5.5; já massas obtidas através de coagulação enzimática apresentam pH semelhante ao encontrado no leite (pH 6.7-6.8) (Van Dender, F. Gallina. A. Zacarchenco, P. B, 2014).

O pH é um fator importante que influencia várias propriedades dos queijos processados, em especial a textura, a reologia e a microestrutura. A influência do pH se deve principalmente aos seus efeitos sobre as interações proteicas, emulsificação de gordura e na hidratação da caseína. Variações no pH levam à formação de queijos que apresentam texturas variando de secas e quebradiças até extremamente macias. Em pH ácido (4,8-5,2) geralmente se produz queijos com estrutura seca, firme e granular, com alta suscetibilidade à separação de fase. Já em pH mais elevados (> 6,0), o queijo processado apresenta-se muito macio e com grande capacidade de retenção de água (Marchesseau et al., 1997; Awad et al., 2002). A extensão da mudança do pH depende da capacidade tamponante das proteínas do queijo processado, do pH da solução de sal emulsificante e da capacidade tampão da mistura de sais emulsificantes empregada (Fox et al., 2000).

O efeito do pH também se manifesta sobre a ação dos sais de polifosfatos utilizados na fabricação de requeijão cremoso. Os sais de fosfato possuem o papel essencial de fazer a troca de iônica de cálcio e sódio na matriz de caseína, transformando o paracaseinato de cálcio insolúvel em paracaseinato de sódio, mais solúvel e com maior capacidade de retenção de água e emulsificação da gordura (Guinee et al., 2004; Shirashoji et al., 2006).

O mecanismo de ação dos diferentes polifosfatos de sódio depende do número de átomos de fósforo presente na cadeia. Os ortofosfatos (HPO_4^-) são considerados agentes complexantes pobres para o cálcio, porém apresentam boa capacidade tamponante. Já os polifosfatos de cadeia mais longa ($P > 3$), possuem baixo poder tamponante e alta capacidade de quelar os íons Ca^{+2} (Dimitrelli et. al, 2005; Mizuno & Lucey, 2005). Polifosfatos de cadeia longa são adicionados a misturas comerciais para aumentar o sequestro de cálcio e assim, a capacidade de dispersão da caseína (Shär & Bosset, 2002).

Reações de hidrólise podem ocorrer em misturas de polifosfatos quando submetidas a tratamento térmico e variações de pH ou força iônica do meio (Lampila & Godber, 2001). O aumento da temperatura e diminuição do pH, podem levar a ocorrência de hidrólise com formação de ortofosfatos e polifosfatos de cadeia curta (McBeath et al., 2007). A hidrólise dos polifosfatos pode então, modificar a proporção de cada espécie de fosfato presente, o que pode levar a mudanças no pH do produto final e nos parâmetros de textura e microestrutura dos queijos.

A maioria dos estudos que utilizam o pH como variável de estudo são focados, principalmente, na alteração do pH final do produto e não no pH da massa utilizada para a fabricação. O uso de ingredientes anidros para fabricação de requeijão cremoso permite o estudo das variáveis de processo isoladamente (por exemplo, pH), pois o produto resultante pode ser considerado um sistema modelo onde as variáveis são controladas e bem conhecidas.

Levando em consideração o crescente consumo de requeijão cremoso pelo mercado nacional e a necessidade de se obter um maior conhecimento sobre os processos tecnológicos a que este produto é submetido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do pH da massa sobre a hidrólise de polifosfatos e as possíveis consequências nas propriedades de textura e microestrutura do requeijão cremoso fabricados a partir de ingredientes anidros.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. *Matérias Primas*

Os ingredientes utilizados para fabricação dos requeijões cremosos foram: Caseinato de cálcio (ALIBRA, Campinas, São Paulo, Brasil); Gordura de leite anidra (FONTERRA, São Paulo, Brasil); Sal emulsificante comercial SELFB4 (Budenheim, Budenheim, Alemanha); Coadjuvantes tecnológicos: ácido láctico 85% (ECIBRA, São Paulo, Brasil), NaOH (Dinâmica, São Paulo, Brasil).

2.2.2. Análises de Caracterização das Matérias-Primas

A gordura de leite anidra foi avaliada em triplicata em relação aos teores de umidade, segundo procedimento AOAC 926.08 (AOAC, 1997) e gordura, pelo método de Mojonnier, segundo procedimento AOAC 989.05 (AOAC, 1997). O caseinato de cálcio foi avaliado em triplicata em relação aos teores de umidade, segundo procedimento AOAC 926.08 (AOAC, 1997); nitrogênio total, pelo método de Kjeldahl, segundo procedimento AOAC 991.20 (AOAC, 1997); e gordura, pelo método de Mojonnier, segundo procedimento AOAC 989.05 (AOAC, 1997).

2.2.3. Processamento dos Requeijões Modelo

Os requeijões foram formulados de acordo com os requisitos exigidos pela legislação para o requeijão cremoso: umidade – máx. 65% e gordura em base seca – mín. 55% (Brasil, 1997).

Os requeijões foram formulados conforme proposto por Cunha & Viotto (2010) e fabricados a partir de ingredientes anidros, com 10,5% de caseína e 2,3 % de sal emulsificante. Soluções de ácido láctico 85% (ECIBRA, São Paulo, Brasil) e NaOH 0,1 M (Dinâmica, São Paulo, Brasil) foram utilizados para o ajuste do pH da massa (5,2, 5,6, 6,0, 6,4 e 6,8). Estes valores de pH foram escolhidos para mimetizar os diferentes tipos de massa que podem ser utilizados na fabricação de requeijão cremoso, ou seja, desde uma massa por acidificação direta a quente até a massa coagulada enzimaticamente. As quantidades adicionadas de cada ingrediente foram definidas a partir do cálculo de balanço de massa.

Para a produção do requeijão foi utilizado o reator automatizado IKA LR 100™, com capacidade para 2 kg de produto final. Primeiramente a água e o caseinato de cálcio foram misturados a temperatura ambiente e homogeneizados

em um misturador. Em seguida, quantidades pré-determinadas de ácido láctico 85% ou NaOH 0,1M foram adicionadas à mistura de caseinato de cálcio e água para alcançar o pH desejado. A mistura foi deixada em repouso por uma noite, sob refrigeração (7°C), para garantir a completa hidratação do caseinato de cálcio. Após a hidratação, a massa de caseinato foi transferida para o reator e o sal emulsificante foi adicionado à mistura. A massa foi então submetida a fusão (40°C) sob agitação a 5000 RPM durante 5 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada a 70°C, momento em que foi adicionada a gordura, e agitada por 2 minutos, a 15000 RPM. A temperatura foi então aumentada para 90°C e mantida por 3 minutos, com agitação constante a 10000 RPM. O produto foi envasado a quente em copos plásticos de 200 mL previamente sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm e selados com tampas de alumínio igualmente sanitizadas. Após resfriamento em banho de gelo, o produto foi armazenado em câmara fria, a 5°C. O procedimento foi realizado em duplicata, resultando em 10 experimentos.

2.2.4. Caracterização Físico-Química dos Requeijões

As amostras de requeijão cremoso foram avaliadas em triplicata, após dez dias de armazenamento refrigerado, em relação aos seguintes parâmetros físico-químicos: pH, pelo método potenciométrico (potenciômetro Digimed DM20, Digicron Analítica Ltd., Santo Amaro, SP, Brasil); umidade, segundo procedimento AOAC 926.08 (AOAC, 1997); nitrogênio total (NT), pelo método de Kjeldahl, segundo procedimento AOAC 991.20 (AOAC, 1997); nitrogênio não-protéico (NNP), pelo método de Kjeldahl, segundo procedimento AOAC 991.21 (AOAC, 1997); proteína total, multiplicando-se o teor de NT pelo fator de conversão 6,38; para determinar o teor de gordura do queijo foi utilizado o método de Gerber (Instituto Adolfo Lutz, 1985), sendo utilizado butirômetro de Gerber especial para amostras sólidas, com uso de ácido sulfúrico para digestão da amostra, e separação em centrífuga com adição de álcool isoamílico para auxiliar na separação das fases aquosa e gordurosa; cálcio total (CT), pelo método de dureza parcial da água, modificado (RAND et al., 1975).

2.2.5. Monitoramento da Hidrólise dos Polifosfatos

Todos os espectros de RMN de ^{31}P foram obtidos em um espectrômetro BRUKER Avance III, operando na frequência de 500 MHz para o núcleo de ^1H e na frequência de 202.35 MHz para o núcleo de ^{31}P . O pico de ortofosfato foi utilizado como referência para integração dos sinais. Foram utilizados capilares contendo D_2O para realizar o *lock* (trava de campo) empregando o núcleo de deutério (^2H).

Os espectros unidimensionais (1D) de ^{31}P RMN com desacoplamento de ^1H , foram obtidos com largura espectral (*Spectral Width*) de 21306.8 Hz e tempo de aquisição de 0,3845 s. Para obter as quantidades relativas dos diferentes tipos de polifosfatos na mistura comercial, um tempo de espera entre as aquisições (*delay time*) de 60 s foi utilizado. Para as amostras dos polifosfatos em leite e solução de caseinato de cálcio foi utilizado uma função exponencial para multiplicar o FID com uma largura de linha (lb) de 20 Hz. Em todos os casos, a frequência de referência foi definida como sendo o pico correspondente ao ortofosfato (P_1), em torno de 1 ppm, dependendo do pH e da temperatura. Os espectros obtidos foram processados com auxílio do software TOPSPIN 3.1® (BRUKER, Alemanha). Para avaliação da taxa de hidrólise foram retiradas amostras no momento em que o sal foi adicionado a massa (fusão da massa) e do produto final após 10 dias de armazenamento refrigerado. Como o ortofosfato é o principal produto da reação de hidrólise, a diferença entre as quantidades relativas desta espécie no início e final do processo foram calculadas como a taxa de hidrólise ocorrida em cada um dos pHs analisados.

Após a retirada das amostras, as mesmas foram colocadas em tubos de RMN de vidro com 5 mm de diâmetro. Imediatamente, as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido para evitar qualquer tipo de degradação dos polifosfatos, até o momento das análises. As amostras foram então colocadas no RMN e analisadas a 40°C e 10°C, respectivamente. Os requeijões foram analisados em duplicata.

2.2.6. Avaliação do Perfil de Textura

O perfil de textura dos requeijões foi determinado utilizando-se um texturômetro universal TAXT2 (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK), equipado com célula de carga de 5,0 kg. Todas as amostras foram analisadas na própria embalagem do requeijão. As embalagens contendo as amostras foram cobertas com papel alumínio e mantidas a 10°C, por uma noite. As amostras foram retiradas da

geladeira uma a uma, imediatamente antes da realização do teste, que foi conduzido segundo metodologia descrita por Rapacci (1997). O probe cilíndrico de 5 cm de diâmetro foi utilizado para realização das análises. Utilizando-se a função “perfil de textura” (TPA) do software do TAXT2, foram obtidos valores para os seguintes parâmetros: elasticidade, gomosidade, adesividade e firmeza. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicata nos dias 1 e 10 de armazenamento refrigerado.

2.2.7. Avaliação da Microestrutura

A microestrutura das amostras de requeijão cremoso, com diferentes pHs de massa, foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Inicialmente, as amostras de requeijão foram colocadas em seringas descartáveis, e o êmbolo foi pressionado delicadamente, de modo a formar “fios” de requeijão. Esses “fios” foram imersos em solução aquosa de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M/ pH 7,2 e fixados por 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os “fios” foram recortados com bisturi e fixados por mais 9 horas, a temperatura ambiente, em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M/ pH 7,2. Após esse período, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1M (2 x 30 min) e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M por 8 horas. As amostras foram então desidratadas gradualmente usando etanol 50% (2 x 15 min), 70% (2 x 30 min), 90% (2 x 15 min), 95% (2 x 15 min) e 100% (3 x 10 min), e acetona 100% (2 x 30 min). Foi realizada a secagem das amostras, em secador de ponto crítico CPD 030 (Baltec AG, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, as amostras foram fraturadas a temperatura ambiente, montadas em suportes cilíndricos específicos de alumínio com cola de prata, metalizadas com ouro 80% de ouro e 20% de paládio usando metalizador SCD 050 (Baltec AG, Balzers, Liechtenstein) e levadas para observação em microscópio eletrônico de varredura FEI QUANTUM (MA, USA) a 5 kV. As amostras foram avaliadas após 10 dias de armazenamento refrigerado.

2.2.8. Planejamento Experimental

O efeito do pH da massa sobre a composição do requeijão foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias ($p < 0,05$). Para as análises realizadas com o tempo (perfil de textura), foi adotado um delineamento do tipo split-plot sendo a sub-parcela obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento. O teste F-ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças entre tratamentos e tempos e a interação tempo versus tratamento, e o teste de Tukey para comparação das médias ($p < 0,05$).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima

O caseinato de cálcio utilizado como matéria-prima apresentou a seguinte composição química média: umidade $5,75 \pm 0,1$ %, gordura $4,22 \pm 0,4$ % e proteína $86,79 \pm 0,6$ %. A gordura de leite anidra apresentou $99,66 \pm 0,01$ % de gordura e $0,23 \pm 0,03$ % de umidade. Estes resultados foram utilizados para os cálculos de balanço de massa realizados antes de cada processamento.

2.3.2. Efeito do pH Na Composição do Requeijão

A Tabela 2.1 mostra o efeito do pH da massa na composição química do requeijão cremoso. O pH não influenciou significativamente ($p < 0,05$) os teores de umidade, gordura, gordura em base seca, cálcio total, proteína total e nitrogênio não proteico, o que era esperado em função do uso de ingredientes anidros para a fabricação do requeijão.

De modo geral, após 10 dias de armazenamento foi observado que o pH das amostras apresentou um pequeno decréscimo, porém este não ultrapassou 0,25 unidades de pH. De fato, após o cozimento e resfriamento de queijos processados, como o requeijão, o equilíbrio iônico e, conseqüentemente, o pH mudam lentamente. Durante o armazenamento, as interações hidrofóbicas estão enfraquecidas devido às baixas temperaturas utilizadas e, interações iônicas ganham mais importância na formação da estrutura do produto. As interações iônicas possuem caráter instável, criando novas funções ácidas que diminuem o pH dos queijos, inibindo um eventual aumento com o tempo (Shär e Bosset, 2002).

Tabela 2.1. Composição química média \pm DP (n=2) dos requeijões fabricados a partir de diferentes pHs após 10 dias de armazenamento refrigerado

	Amostras				
	pH 5,2	pH 5,6	pH 6,0	pH 6,4	pH 6,8
Umidade, %	62,20 \pm 0,47 ^a	64,99 \pm 1,4 ^a	63,14 \pm 0,1 ^a	61,20 \pm 0,7 ^a	62,10 \pm 0,1 ^a
Gordura, %	22,25 \pm 0,17 ^a	21,75 \pm 1,06 ^a	23,25 \pm 0,17 ^a	23 \pm 0,35 ^a	22 \pm 1,06 ^a
Gordura em base seca, %	59,11 \pm 0,93 ^a	62,40 \pm 0,03 ^a	62,52 \pm 0,32 ^a	62,07 \pm 0,76 ^a	60,20 \pm 0,58 ^a
Cálcio Total, mg/100g	197,91 \pm 1,29 ^a	192,77 \pm 1,99 ^a	196,96 \pm 2,78 ^a	192,69 \pm 1,84 ^a	194,32 \pm 2,08 ^a
Nitrogênio não proteico, %	0,02 \pm 0,00 ^a				
Proteína, %	10,89 \pm 0,10 ^a	10,58 \pm 0,53 ^a	10,92 \pm 0,12 ^a	10,96 \pm 0,10 ^a	10,96 \pm 0,29 ^a
pH	5,19 \pm 0,01 ^a	5,59 \pm 0,02 ^b	5,75 \pm 0,02 ^c	6,08 \pm 0,01 ^d	6,22 \pm 0,00 ^e

¹Médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

² DP=Desvio Padrão

2.3.3 Efeito do pH na Hidrólise dos Polifosfatos

A hidrólise de polifosfatos ocorre, principalmente, pela ruptura de grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$, formando ortofosfatos como produto final de reação. Dessa forma, a diferença na quantidade de ortofosfatos presentes no início e no final do processo de fabricação do requeijão diz respeito à taxa de hidrólise ocorrida.

O espectro de RMN do Requeijão Cremoso em pH 6,8 é apresentado na Figura 2.1.

O espectro do produto final revelou a presença, principalmente, de ortofosfatos (entre 0 a 2 ppm) e polifosfatos de cadeia longa ($P > 3$), entre -21 e -24 ppm.

A Figura 2.2 mostra a taxa de hidrólise do requeijão cremoso nos diferentes valores de pH estudados.

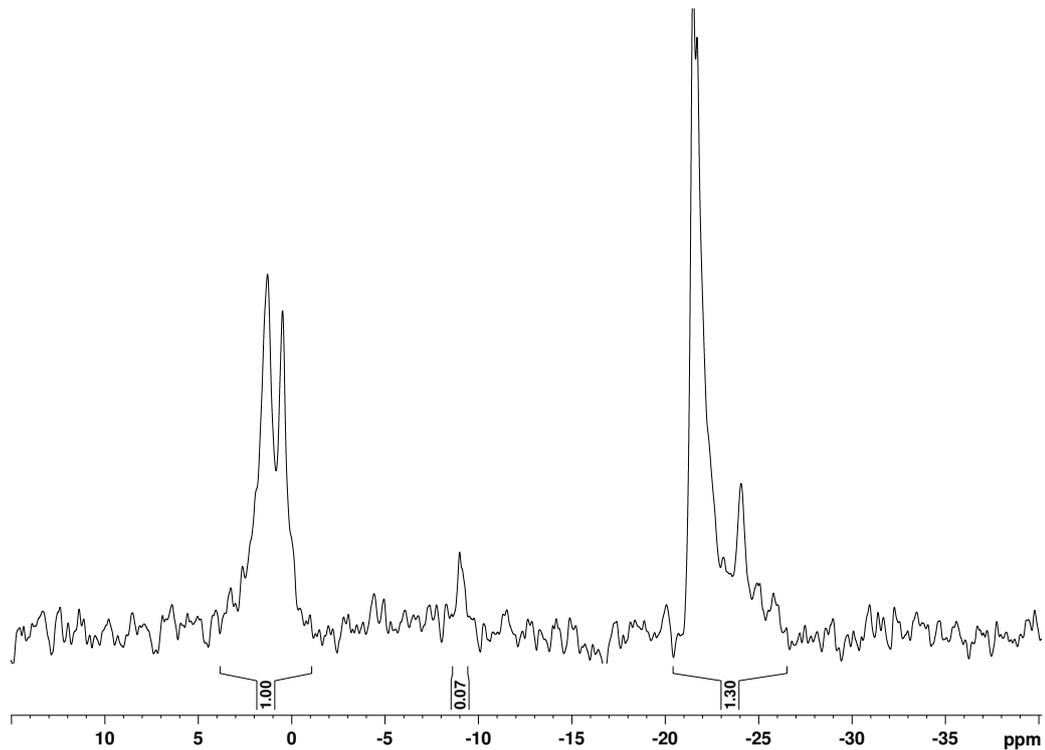


Figura 2.1. Espectro de RMN de ^{31}P do requeijão cremoso modelo em que foi adicionado sal de polifosfato comercial, em pH 6,8 a 10°C . LB de 20 MHz, após 10 dias de armazenamento refrigerado (outros espectros não foram mostrados).

A Figura 3.2 mostra que a hidrólise ocorreu com mais intensidade nos pHs mais ácidos (pH 5,2 e 5,6). Isso aconteceu devido à maior concentração de íons H^+ presentes nestas amostras. A hidrólise de polifosfatos é catalisada por íons H^+ , pois o próton interage com a dupla ligação do oxigênio na unidade de fosfato terminal, o que deixa a ligação mais propícia ao ataque nucleofílico da água, facilitando a quebra da ligação (Jager, H & Heyns, A. M., 1998).

Surpreendentemente, a hidrólise em pH 5,6 foi maior que no pH 5,2. Esse fato talvez possa ser explicado por que, em pH 5,2, a rede proteica encontra-se mais compacta, devido a diminuição de cargas negativas e, conseqüentemente, menor repulsão eletrostática entre as cadeias de caseína. Para que haja quebra da ligação P-O e formação de íons ortofosfatos é necessário a ocorrência de colisões entre os polifosfatos, os íons H^+ e as moléculas de H_2O (Jager, H & Heyns, A. M., 1998). A rede mais compacta pode ter impedido, neste caso, a mobilidade dessas moléculas, diminuindo assim a taxa de hidrólise em pHs mais próximos do ponto isoelétrico da caseína.

Hidrólise Polifosfatos

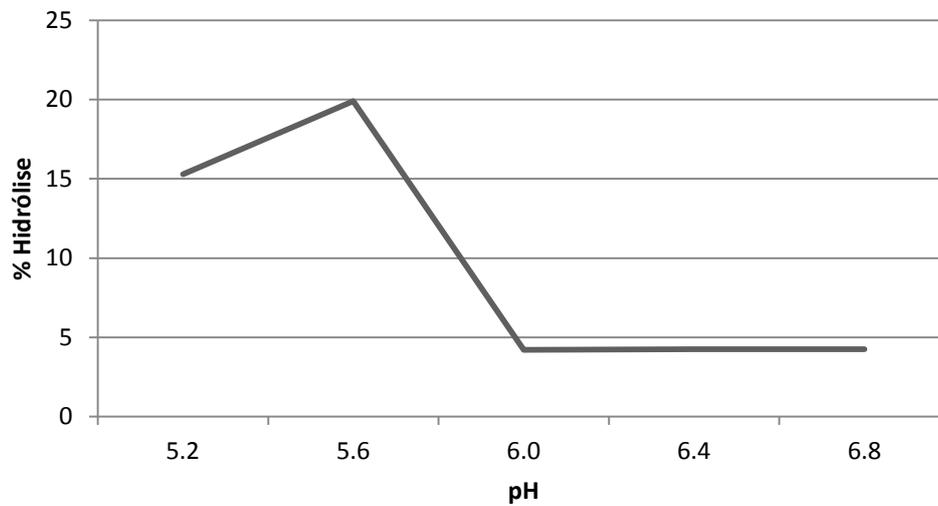


Figura 2.2. Efeito do pH na hidrólise dos polifosfatos em requeijões produzidos a partir de massas com pHs de 5,2, 5,6, 6,0, 6,4 6,8.

Nos requeijões fabricados a partir de massas com valores de pH entre 6.0 a 6.8 (Figura 2.2), a taxa de hidrólise foi menor e manteve-se constante (em torno de 4%), quando comparada com os demais pHs. O aumento do pH diminui a concentração de íons H^+ disponíveis para atuar como catalisadores das reações de hidrólise dos polifosfatos. A pequena taxa de hidrólise encontrada nestas amostras, provavelmente, ocorreu devido à presença de íons cálcio. Os metais alcalinos, particularmente os altamente carregados como Ca^{+2} , também podem catalisar a quebra hidrolítica dos fosfatos. Isso ocorre devido ao efeito quelante do cátion sobre os átomos de oxigênio nos polifosfatos, que resulta em uma maior suscetibilidade do átomo de fósforo ao ataque nucleofílico da água (Molins, 1991).

A maior porcentagem de ortofosfatos encontrada, ao final do processo, nas amostras fabricadas a partir de massas com pH de 5,2 e 5,6 (Figura 2.2), também pode explicar a manutenção destes valores de pH no produto final e a diminuição do pH (Tabela 2.2) nos produtos que apresentaram menor taxa de hidrólise. De acordo com Nagyová et al.(2013), o pH das amostras diminui quando o tamanho da cadeia linear de polifosfatos aumenta, ou seja, uma taxa menor de hidrólise mantém praticamente constante a concentração de polifosfatos de cadeia longa, como pode ser visto no espectro de RMN de ^{31}P . Isso pode ser explicado pela liberação de prótons (muito mais numerosos em polifosfatos de cadeia longa)

durante a fusão, que leva a diminuição do pH. Por outro lado, a maior taxa de hidrólise encontrada nas amostras mais ácidas (pH 5,2 e 5,6) aumenta a porcentagem de ortofosfatos, conhecidos como potentes agentes tamponantes (Schär e Bosset, 2002;. Guinee et al., 2004).

2.3.4. Efeito do pH Sobre a Textura e Estrutura do Requeijão Cremoso

Os resultados obtidos na avaliação instrumental da textura são apresentados na Tabela 3.2. O pH influenciou significativamente ($p < 0,05$) todos os parâmetros de textura avaliados, com exceção da elasticidade.

A Tabela 2.3 apresenta a avaliação estatística do efeito do pH e do tempo de estocagem nos parâmetros de textura do requeijão cremoso.

Em queijos, a elasticidade é conferida essencialmente pela matriz proteica (Fox et al., 2000), que é a principal responsável pela estrutura do produto e pela sua flexibilidade e recuperação depois que cessa a aplicação da tensão. Uma vez que não houve diferença entre os requeijões em relação ao teor de proteína (Tabela 2.1), os valores de elasticidade também não variaram significativamente (Tabela 2.2).

Os resultados indicam que a firmeza dos requeijões diminuiu com o aumento do pH. Isso pode ser explicado pelo fato de que, com o aumento do pH a carga negativa das proteínas aumenta, o que promove uma maior repulsão eletrostática entre as cadeias de caseína. O aumento da repulsão eletrostática leva a uma estrutura mais aberta, com maior ligação de água.

Tabela 2.2. Graus de Liberdade e probabilidades para os diferentes pHs dos queijos durante o tempo de estocagem.

	Firmeza			Elasticidade			Gomosidade			Adesividade		
	GL	QM	P	GL	QM	P	GL	QM	P	GL	QM	p
pH	4	203,5415	0,000000*	4	0,000202	1,00	4	0,02563	0,000020*	4	1340,439	0,000000*
Tempo	1	0,6159	0,346234	1	0,000587	1,00	1	0,02250	0,007937*	1	21,521	0,019364*
Interação pH*Tempo	4	1,3250	0,117432	4	0,002717	1,00	4	0,00724	0,057121	4	2,126	0,680792

gl = graus de liberdade; QM = quadrado médio; p = probabilidade

Tabela 2.3. Valores médios (n=4) dos parâmetros de textura para as amostras de requeijão cremoso fabricados a partir de diferentes phs após 1 dia de fabricação e armazenamento refrigerado

	Amostras				
	pH 5,2	pH 5,6	pH 6,0	pH 6,4	pH 6,8
Firmeza (N)	10,82 ^a ± 0,34	4,01 ^b ± 0,44	2,15 ^c ± 0,32	0,85 ^d ± 0,12	1,13 ^d ± 0,38
Elasticidade(-)	0,913 ^a ± 0,04	0,915 ^a ± 0,9	0,953 ^a ± 0,01	0,975 ^a ± 0,08	0,977 ^a ± 0,01
Gomosidade (-)	5,49 ^a ± 0,54	2,58 ^b ± 0,23	1,48 ^c ± 0,41	0,57 ^d ± 0,16	0,81 ^d ± 0,23
Adesividade(N.s)	28,06 ^a ± 4,30	9,70 ^b ± 1,63	4,36 ^c ± 0,60	4,17 ^c ± 0,69	2,59 ^c ± 0,84

¹Médias com letras iguais, na mesma linha, não diferem significativamente entre si (p>0,05). ²Média ± DP.

Além disso, o aumento do pH pode diminuir as interações hidrofóbicas entre as caseínas a medida em que aumenta a repulsão eletrostática (Fox et al., 2000, Horne, 1998; Lucey et al, 2003). Outro fator que pode ter influenciado é que, com a elevação do pH aumenta também o poder sequestrante de cálcio do sal emulsificante, o que resulta numa maior dispersão da caseína durante a fabricação do requeijão cremoso levando a uma diminuição das ligações de fosfato de cálcio coloidal entre as micelas (Horne 1982; Fox et al., 2000).

A taxa de hidrólise também pode explicar a menor firmeza encontrada nos produtos com pH mais elevados, isto é, pHs de 6,0 a 6,8 (Tabela 2.3). Nessa faixa de pH houve menor taxa de hidrólise, ou seja, maior proporção de polifosfatos de cadeia longa (P>3). Os polifosfatos acrescentam múltiplas cargas negativas às caseínas, o que provavelmente conduziu a uma menor intensidade das interações hidrofóbicas entre as cadeias dispersas e assim, diminuiu a firmeza da matriz.

Outro fator, que pôde ser observado no espectro de RMN de ³¹P (Figura 2.1) foi a ausência ou proporção muito pequena de difosfatos nas amostras analisadas. Segundo Mizuno & Lucey (2007), deve existir uma concentração ótima de difosfatos para formação do gel. Quantidades excessivas ou insuficientes levam a formação de géis muito fracos.

Em relação à adesividade, o requeijão fabricado a partir de pH 5,2 apresentou a maior adesividade, seguido do requeijão fabricado a partir de pH 5,6. Para os requeijões fabricados com valores de pH entre 6,0 a 6,8, a adesividade foi menor e as amostras não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Queijos fabricados com pHs elevados, acima de 6,0, podem ser considerados como uma emulsão proteica concentrada, enquanto os queijos que apresentam pHs mais ácidos (entre 5,2 e 6,0) como uma massa de caseína porosa e partículas de gordura. Queijos com pHs mais altos apresentam uma “textura longa” e são menos adesivos que aqueles fabricados com pHs mais baixos (Watkinson et al., 2001).

O tempo de armazenamento também influenciou significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros gomosidade e adesividade, mas não influenciou a firmeza e elasticidade. Durante os 10 dias de estocagem dos requeijões (sob refrigeração), foi observado um pequeno aumento desses parâmetros. Para o parâmetro de gomosidade houve aumento de 2,05 para $2,32 \pm 0,56$, já para a adesividade o aumento foi de 9,12 para $10,37 \pm 1,30$. Apesar de estatisticamente significativo, essa diferença é muito pequena e não deve ter importância prática.

O efeito do aumento ou diminuição de cargas negativas também pôde ser observado pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), apresentada na Figura 2.3. O requeijão fabricado com pH de 5,2 (Figura 2.2.1) apresentou uma estrutura bastante compacta, com formação de grandes aglomerados, devido a forte associação da rede proteica. A fabricação de requeijão utilizando como ponto de partida uma massa, cujo pH se aproxima do ponto isoelétrico da caseína, leva à formação de um produto final em que a rede proteica possui um alto grau de interação devido à diminuição da repulsão eletrostática (Marchessau, 1997). Devido ao método de preparação das amostras, a distribuição das partículas de gordura fica limitada em pH próximo ao ponto isoelétrico das caseínas e apenas algumas cavidades são perceptíveis em meio aos agregados proteicos. Estes resultados estão de acordo com os dados referentes aos parâmetros de textura, que, para o mesmo pH, apresentou a maior firmeza e adesividade.

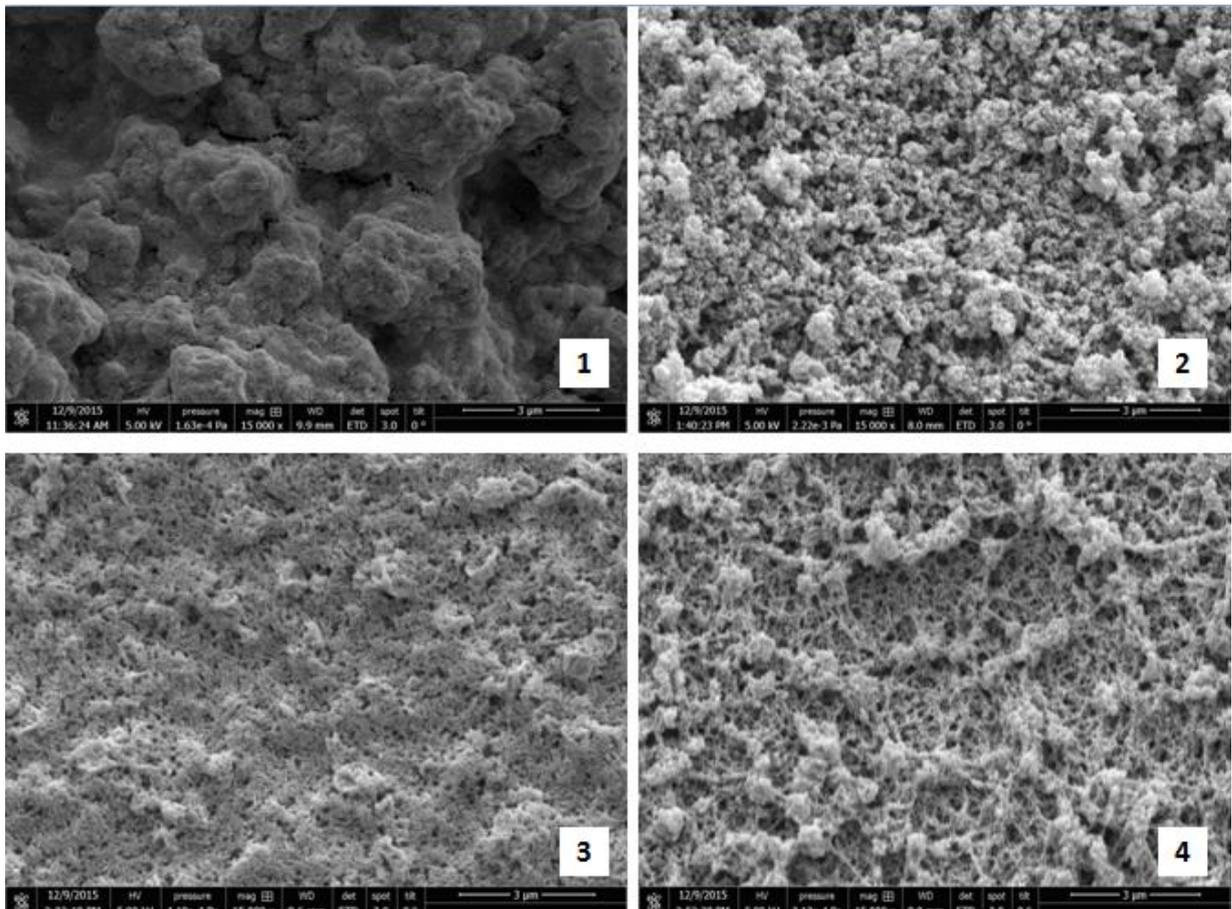


Figura 2.3. Microscopia eletrônica de varredura dos requeijões fabricados a partir de pH 5,2 (1), 5,6 (2), 6,4 (3) e 6,8 (4). Os espaços vazios indicam a presença de partículas de gordura no queijo original. Bar = 3µm

O aumento do pH para 5.6 (Figura 2.3.2) resultou na formação de uma rede menos compacta, com diminuição do tamanho dos agregados proteicos. Neste pH, os glóbulos de gordura já se tornam mais visíveis. O aumento do pH das amostras diminuiu as interações proteína-proteína, levando a formação de uma rede mais aberta e conseqüentemente menos firme, conforme apontam os resultados de firmeza (Tabela 2.3).

Requeijões fabricados a partir de massas com pH de 6.4 (Figura 2.3.3) apresentaram uma rede densa e homogênea, com os glóbulos de gordura homogeneamente distribuídos na matriz. As amostras fabricadas a partir de pH 6.0 apresentaram resultados muito semelhantes as amostras com pH 6.4 (resultados não mostrados). O aumento das cargas negativas das caseínas permite a formação de diferentes tipos de interações, como, interações eletrostáticas, pontes de cálcio, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. A presença dessas ligações melhora a absorção e ligação de água pela matriz proteica fazendo que seja distribuída de forma uniforme pela matriz. Este resultados estão de acordo com

o trabalho de Kiely et al, (1993), onde os pesquisadores observaram que, aumentando-se o pH de drenagem da massa de queijo muçarela para 6.1 (semelhante ao pH do produto final analisado), há um aumento da fusão das partículas de paracaseína produzindo-se uma rede tridimensional mais contínua.

Já para os requeijões fabricados com pH 6.8 (Figura 2.2.4), a microestrutura do requeijão apresenta-se diferente. A rede proteica encontra-se mais aberta e menos densa que aquela apresentada pelo produto com pH de 6.4. Verifica-se também o aparecimento de pequenos agregados em forma de esferas de aproximadamente 0,5 a 1 μm . Mais uma vez, devido a forte repulsão eletrostática, causada pelo alto valor de pH do requeijão, pode ocorrer uma reaproximação de cadeias polipeptídicas não carregadas, que inicialmente estavam distantes umas das outras. A perda das interações eletrostáticas pode ser compensada pela formação de novas interações, como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Marchessau, 1997). A presença de novas ligações e formação de novos agregados pode explicar o pequeno aumento no parâmetro de firmeza observado para estas amostras em relação às amostras fabricadas a partir de massa com pH de 6.4.

A Figura 2.4 mostra que a diferença na textura e microestrutura também pode ser observada nas características visuais. O requeijão com pH mais baixo exibiu aspecto bastante duro e quebradiço quando comparados com as amostras com pHs mais elevados que apresentaram textura mais mole, assemelhando-se a um líquido viscoso. Estes resultados estão de acordo com os parâmetros de textura obtidos e também com resultados observados nos trabalhos de Marchessau (1997) e Muslow et al,. (2007).

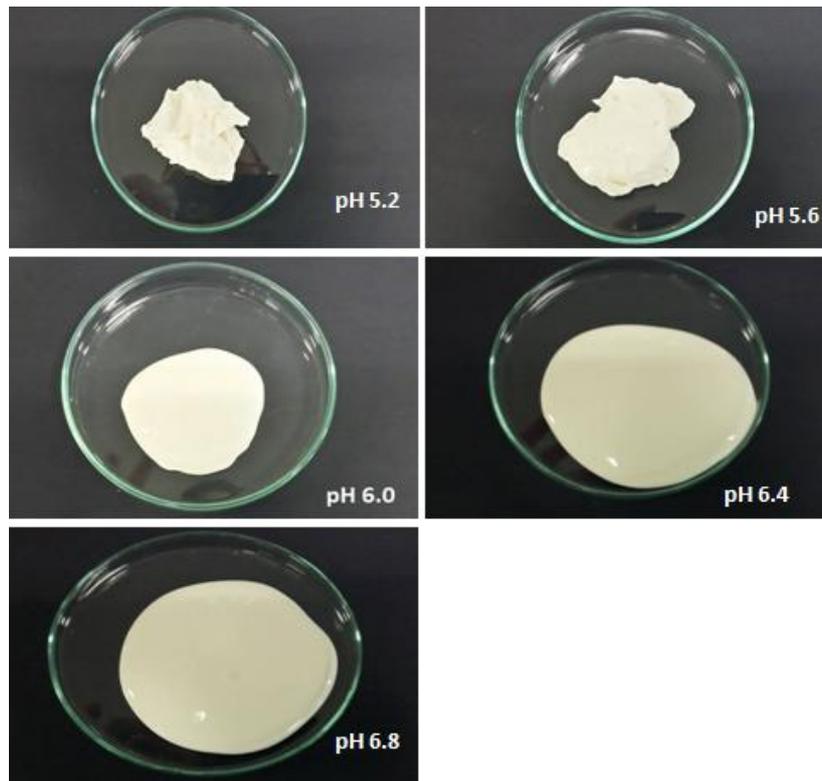


Figura 2.4. Características visuais dos requeijões fabricados a partir de diferentes pHs (cada pH é indicado na figura correspondente).

2.4. CONCLUSÃO

Pequenas variações no pH da massa utilizada na fabricação de requeijão cremoso afetaram substancialmente a estrutura e as propriedades dos queijos. Requeijões fabricados a partir de massa com pH 5.2 a 5.6 (faixa de pH da massa obtida por acidificação direta a quente) apresentaram textura firme e quebradiça, enquanto que requeijões fabricados a partir de pHs mais elevados (6.0 a 6.8) resultaram em produtos com textura mais mole, assemelhando-se a um líquido viscoso. Variações no pH também afetaram a taxa de hidrólise dos polifosfatos presentes no sal emulsificante, o que se refletiu e nas propriedades de textura dos queijos. Assim, a escolha do tipo de massa a ser utilizada (acidificação direta a quente, coagulação enzimática) é de extrema importância na fabricação de requeijões com propriedades específicas, pois mudanças sutis em parâmetros como pH afetarão de maneira significativa as características e qualidade do produto final.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC – Association of official analytical chemists. 1997. Official methods of analysis of AOAC International. 16 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International. Vol. II.
- AOCS – American Oil Chemist’s Society. 1998. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5 ed. Champaign: AOCS.
- Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. Queijos: Mercado Total Brasileiro. São Paulo, Brasil, 2011. Disponível em: < <http://www.abiq.com.br/> Acesso em: 06/2015.
- Awad, R.A., Abdel-Hamid, L.B., Ei-Shabrawy, S.A., Singh, R.K. 2002. Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Lebensmittel Wissenschaft and -Technologie*, 35, 2002, 54–61.
- Brasil, Ministério do Estado da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão. Portaria nº 359, de 04 de dezembro de 1997. Disponível em <http://www.agricultura.org.br> . Acesso em: 15 out. 2015.
- Casas, J. M., García, M. P., Sanz, M., Cacho, F., Pérez, J. 2010. ³¹P NMR spectroscopic studies of the influence of the environment in the degradation process of the Graham’s salt. *Ceramics International*. 36 (2010) 39-46.
- Cunha, C.R., Viotto, W.H. 2010. Casein peptization, functional properties, and sensory acceptance of processed cheese spreads made with different emulsifying salts. *Journal of Food Science*, v.75, p.113-120.
- Dimitrelli G., Thomareis, A.S., Smith, P.G. 2005. Effect of emulsifying salts on casein peptization and apparent viscosity of processed cheese. *International Journal of Food Engineering*, v.1, n.4, p.1-15.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. 2000. Processed Cheese and Substitute or Imitation Cheese Products. In: FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg: Aspen. Cap.18, p.429-451.
- Guinee, T. P., Caríc, M., Kaláb, M. 2004. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In Fox, P. F.; McSweeney, P. L.H.;

- Cogan, T. M.; Guinee, T. P. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. 2. Major cheese groups 3rd Ed. London: Elsevier Ltd., cap. 21, p. 349-394.
- Horne, D. S. 1998. Casein interactions: Casting lighth on the Black Boxes, the structure in dairy products. *Int. Dairy J.* 8:171-177.
- Jager, H., Heyns, A. M. 1998. Kinetics of Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Polyphosphate in Water. *The journal of physical chemistry A*, 102 (17), pp 2838–2841.
- Kiely, P.S., Kindstedt, G.M., Hendricks, J.E., Levis, J.J., Yun, D.M., Barbano. 1993. Age related changes in the microstructure of Mozzarella cheese. *Food Structure*. 12, pp. 13–20
- Lampilla, L. E., Godber, J. P. Food Phosphates. 2001. In THORNGATE, J. H.; SALMINEN , S.; BRANEN, L. A .; DAVIDSON, M. P . *Food Additives*, CRC Press, cap. 25.
- Lee, S. K., Buwalda, R. J., Euston, S. R., Foegeding, E. A., Mckenaa, A. B. 2003. Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology*, v.36, p. 339–345.
- Lee, S.K., Anema, S., Klostermeyer, H. 2004. The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *International Journal of Food Science and Technology*, v.39, p.763-771.
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., Horne, D. S. 2003. Invited Review: Perspective on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 9, p. 2725-2743.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A., Cuq, J.L. 1997 Influence of pH on protein interactions and microstructure of processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 1483–1489
- McBeath, T.M., Lombi, E.; McLaughlin, M. J., Bumann, E. K. 2007. Polyphosphate-fertilizer solution stability with time, temperature, and pH. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 170(3), 387-391.

- Metzger, L.E., Barbano, D.M., Kindstedt, P.S. 2001. Effect of milk preacidification on low fat mozzarella cheese: III. Post-melt chewiness and whiteness. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.6.
- Mizuno, R., Lucey, J. A. 2005. Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium-phosphate–protein interactions in casein micelles. *Journal of Dairy Science*, v. 88, p. 3070-3078.
- Mizuno, R., Lucey, J. A. 2007. Properties of milk protein gels formed by phosphates. *Journal of Dairy Science*. v. 90, p. 4524–4531.
- Molins, R.A. 1991. *Phosphates in Food*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Mulsow, B. B., Jaros, D., Rohm, H. 2007. Processed cheese and cheese analogues. In: *Structure of dairy products*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p. 210-235.
- Nagyová, G., Bunka, F., Salek, R. N., Cerniková, M., Mancik, P., Gruber, T., Kuchar, D. 2013. Use of sodium polyphosphates with different linear lengths in the production of spreadable process cheese. *Journal of Dairy Science*. v. 97, p.111-122.
- Rand, M.C., Greensberg, A.E., Taras, M.J. (Eds.). 1975, *Standard methods for examination of water and wastewater*. 14a. ed. Washington: American Public Health Association. p.189-190
- Rappaci, M. 1997. Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta. Campinas. 144p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Schär, W., Bosset, J.O. 2002. Chemical and physico-chemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. A review. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology*, v. 35, p. 15-20.
- Shirashoji, N., J. J. Jaeggi., Lucey, J. A. 2006. Effect of trisodium citrato concentration and cooking time on the physicochemical proprieties of pasteurized process cheese. *J. Dairy Sci.* 89:15-28.

- Turner, B. L., Mahieu, N., Condron, L. M. 2003 Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH-EDTA extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67: 497–510.
- Van Dender, A. G. F.; Gallina, D. A.; Zacarchenco, P. B. 2014. Características dos sais fundentes e seu papel na obtenção de queijos processados. In: VAN DENDER, A. G. F. (Ed.). *Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle de processo e aspectos de mercado*. São Paulo: Setembro, cap. 2, p. 29, 56.
- Watkinson P, Coker C, Crawford R, Dodds C, Johnston K, McKenna A, White N. 2001. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*. 11:455–464.

DISCUSSÃO GERAL

O pH influenciou a hidrólise de polifosfatos nas diferentes matrizes. Em pHs mais ácidos (5,2 e 5,6), a formação de ortofosfatos foi mais acentuada que em pHs próximos da neutralidade (6,0 a 6,8) (Capítulo 1, Figura 1.2).

Em água, a porcentagem de hidrólise aumentou com a diminuição do pH (de 6,8 a 5,2). Isso ocorreu devido à protonação dos grupos fosfato terminal das cadeias dos polifosfatos pelo aumento da concentração de íons H^+ . Em soluções ácidas, a protonação do oxigênio da dupla ligação na unidade de fosfato terminal, ativa o polifosfato para o ataque nucleofílico da água.

Em leite, o comportamento de hidrólise foi semelhante à água, porém, as taxas de hidrólise encontradas em cada pH foram mais elevadas que aquelas encontradas para a água (Capítulo 1, Figura 1.2). Tal fato pode estar relacionado a presença de íons Ca^{2+} , que catalisam a hidrólise dos polifosfatos devido ao seu efeito quelante sobre o oxigênio do polifosfato, resultando numa maior suscetibilidade do átomo de fósforo ao ataque nucleofílico da água.

A solução de caseinato de cálcio apresentou um comportamento diferente em relação à hidrólise dos polifosfatos (Capítulo 1, Figura 1.2). Em geral, houve aumento da hidrólise com a diminuição do pH, na faixa de 6,8 a 5,6, porém, esse comportamento mudou para o caseinato a pH 5,2. Neste pH, houve uma diminuição da taxa de hidrólise, o que pode ser explicado pela estrutura proteica mais compacta encontrada nestes valores de pH, devido a proximidade com o ponto isoelétrico das caseínas. A rede proteica compactada pode ter impedido a difusão e a consequente colisão dos polifosfatos com as moléculas de água, uma vez que também não houve agitação durante a análise de RMN de ^{31}P .

Como apresentado no Capítulo 2, a taxa de hidrólise dos polifosfatos em requeijão cremoso apresentou a mesma tendência das amostras em leite e caseinato de cálcio, ou seja, a hidrólise ocorreu com mais intensidade nos pHs mais ácidos (pH 5,2 e 5,6) quando comparados com as amostras fabricadas a partir de massas com pH mais alcalinos (pH 6,0 a 6,8) (Capítulo 2, Figura 2.2).

O requeijão fabricado a partir de uma massa com pH de 6,8 apresentou taxa de hidrólise maior que aquela apresentada em solução de caseinato de cálcio (Capítulo 1, Figura 1.2), com o mesmo valor de pH. Isso provavelmente ocorreu devido à agitação intensa usada na fabricação do requeijão, ausente nos experimentos com as matrizes, o que pode ter provocado uma maior colisão entre

moléculas e os íons presentes no meio (H^+ e Ca^{+2}), resultando em maior taxa de hidrólise.

A hidrólise dos polifosfatos também influenciou o pH final dos requeijões (Capítulo 2, Figura 2.2). A maior taxa de hidrólise encontrada nas amostras mais ácidas (pH 5,2 e 5,6) aumenta a porcentagem de ortofosfatos, conhecidos como potentes agentes tamponantes, o que explica a manutenção do pH da massa no produto final. Já para os produtos fabricados a partir de massa com valores de pH mais alcalinos (6,0 a 6,8), o pH do produto final diminuiu, devido a maior liberação de prótons pelos polifosfatos de cadeia durante a fusão.

O pH também influenciou significativamente ($p < 0,05$) todos os parâmetros de textura avaliados, com exceção da elasticidade (Capítulo 2, Tabela 2.3). Os resultados indicaram que a firmeza dos requeijões diminuiu com o aumento do pH. A elevação do pH aumenta a carga negativa das proteínas. Esse aumento das cargas negativas das micelas leva a uma estrutura mais aberta, com maior ligação de água e, conseqüentemente, menor firmeza do produto. Possivelmente, o aumento do poder sequestrante de cálcio pelo sal emulsificante também contribuiu para a diminuição da firmeza em função do aumento da dissociação das caseínas.

A hidrólise do polifosfato também pode explicar a menor firmeza encontrada nos produtos com pH mais elevados (Capítulo 2, Tabela 2.3). A taxa de hidrólise mais baixa na faixa de pH 6,0 a 6,8 manteve praticamente constante o teor de polifosfatos de cadeia longa ($P > 3$), que acrescentam múltiplas cargas negativas às caseínas, aumentando a repulsão eletrostática e diminuindo a firmeza do queijo processado.

O efeito das cargas negativas também pôde ser observado pela análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Capítulo 2, Figura 2.3). O requeijão fabricado com pH de 5,2 (Figura 2.3.1) apresentou uma estrutura bastante compacta, com formação de grandes aglomerados, devido a forte associação da rede proteica. Neste pH, as caseínas se aproximam de seu ponto isoelétrico, o que leva a formação de um produto final em que a rede proteica possui um alto grau de interação devido diminuição da repulsão eletrostática. Os requeijões fabricados a partir de massas com pH de 6,4 e 6,8 (Capítulo 2, Figuras 2.3.3 e 2.3.4) mostraram uma rede densa e homogênea, com os glóbulos de gordura homogeneamente distribuídos na matriz. O aumento das cargas negativas das caseínas permite a

formação de diferentes tipos de interações que levam a melhor absorção e ligação de água pela matriz proteica, tornando-a menos firme.

A microestrutura dos requeijões fabricados a partir de pH 6,8 (Capítulo 2, Figura 2.3.4), mostrou a formação de uma rede proteica mais aberta e menos densa que aquela apresentada pelo produto com pH de 6,4, com o aparecimento de pequenos agregados em forma de esferas. A forte repulsão eletrostática pode ter promovido uma reaproximação de cadeias polipeptídicas não carregadas, que inicialmente estavam distantes umas das outras, com formação de novas ligações. As novas ligações formadas podem explicar o pequeno aumento no parâmetro de firmeza observado para estas amostras em relação às amostras fabricadas a partir de massa com pH 6,4.

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho avaliou o efeito do pH (5,2, 5,6, 6,0, 6,4 e 6,8) sobre a hidrólise de polifosfatos de sódio em água, leite e caseinato de cálcio. Também foi avaliado o efeito do pH da massa sobre a hidrólise de polifosfatos na produção de requeijão cremoso e sua influência sobre os parâmetros de textura e microestrutura dos queijos.

A diminuição do pH (de 6,8 para 5,2) aumentou a taxa de hidrólise, independente da matriz utilizada. Os íons H^+ catalisaram a reação de hidrólise e a presença de íons Ca^{2+} favoreceu ainda mais a reação. Em amostras líquidas, como o leite, pelo fato de estas permitirem livre movimento das moléculas, as reações de hidrólise ocorreram de maneira mais significativa, devido a uma maior chance de colisão entre as moléculas.

No requeijão cremoso, o efeito do pH sobre hidrólise dos polifosfatos seguiu a mesma tendência observada nas soluções mais simples, ou seja, aumento da hidrólise com diminuição do pH, que se refletiu em mudanças nas propriedades de textura e estrutura dos queijos. Requeijões fabricados a partir de massa com pH de 5,2 a 5,6 (faixa de pH da massa obtida por acidificação direta a quente) apresentaram textura firme e quebradiça, com formação de grandes agregados proteicos. Já os requeijões fabricados a partir de pHs mais elevados (6,0 a 6,8) resultaram em produtos com textura mais mole, assemelhando-se ao um líquido viscoso, com estrutura densa e homogênea.

Os resultados apresentados indicam que a escolha da massa a ser utilizada na fabricação de queijos processados, como o requeijão, é de extrema importância para manutenção das propriedades desejáveis no produto final. Além disso, as propriedades funcionais de queijos processados podem ser manipuladas por variações nos valores de pH da massa utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. Queijos: Mercado **Total Brasileiro**. São Paulo, Brasil, 2011. Disponível em: < <http://www.abiq.com.br/> >. Acesso em: 15 out. 2015.
- AWAD, R.A., ABDEL-HAMID, L.B., EI-SHABRAWY, S.A. & SINGH, R.K. Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. **Lebensmittel Wissenschaft and -Technologie**, 35, 2002, 54–61.
- BOURNE, M. C. Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. 2nd Ed. **Academic Press**, New York, NY, 2002.
- BRASIL. Ministério do Estado da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão. **Portaria nº 359**, de 04 de dezembro de 1997. Disponível em <http://www.agricultura.org.br> . Acesso em: 15 out. 2015.
- BUNKA, F.; DOUDOVÁ, L.; WEISEROVÁ, E.; KUCHAR, D.; MICHÁLEK, J.; SLAVÍKOVA, S.; KRACMAR, S. The effect of different ternary mixtures of sodium phosphates on hardness of processed cheese spreads. **International Journal of Food Science and Technology**. V. 47, p. 2063–2071, 2012.
- CHEN, L.; LIU, H. Effect of emulsifying salts on the physicochemical properties of processed cheese made from mozzarella. **Journal of dairy science**. v.95, p. 4823-4830, 2012.
- CUNHA, C. R. **Papel da gordura e do sal emulsificante em análogos de requeijão cremoso**. Campinas, 2007. 177p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CUNHA, C.R.; VIOTTO, W.H. Casein peptization, functional properties, and sensory acceptance of processed cheese spreads made with different emulsifying salts. **Journal of Food Science**, v.75, p.113-120, 2010.
- DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-review and possible improvements. **Soft Matter** - The Royal Society of Chemistry. v 7, p. 2265- 2272, 2011.
- DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A.S. Instrumental textural and viscoelastic properties of processed cheese as affected by emulsifying salts and in relation to its

- apparent viscosity. **International Journal of Food Properties**, 12, 261–275, 2009.
- DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A.S.; SMITH, P.G. Effect of emulsifying salts on casein peptization and apparent viscosity of processed cheese. **International Journal of Food Engineering**, v.1, n.4, p.1-15, 2005.
- FERNANDES, A. G. Parâmetros fundamentais para o processamento de queijos fundidos. In: MARTINS, J. F. & FERNANDES, A. G. **Processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas, ITAL, Cap.5, p.1-11, 1981.
- FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Aspen Publishers, 2000.
- GREENFIELD, S. & CLIFT, M., Analytical Chemistry of Condensed Phosphates. **Pergamon Press, Oxford**, 1975.
- GUINEE, T. P. Processed Cheese. In: McWEENEY, P. L. H. (Eds) **Cheese problems solved. 1st Ed.** CRC Press, USA, p. 387, 2007.
- GUINEE, T. P.; CARÍC, M.; KALÁB, M. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In Fox, P. F.; McSweeney, P. L.H.; Cogan, T. M.; Guinee, T. P. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology. 2. Major cheese groups 3rd Ed.** London: Elsevier Ltd., cap. 21, p. 349-394, 2004.
- HEERTJE, I. Structure and function of food products: A review. **Food Structure**, v.12, p. 343-364, 1993.
- HOLT, C. & HORNE, D.S. The hairy casein micelle: evolution of the concept and its implication for dairy technology. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 50, 85–111, 1996.
- HORNE, D. S., Casein interactions: Casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products. **Int. Dairy J.** 8:171-177, 1998.
- JOHNSON, M. E.; LUCEY, J. A. Calcium: a key factor in controlling cheese functionality. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 61, p. 147-153, 2006.
- KALIAPPAN, S.; LUCEY, J. A. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 4255-4263, 2011.

- KAPOOR, R.; METZGER, L. E. Process cheese: scientific and technological aspects e a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 7, p. 194-214, 2008.
- LAMPILLA, L. E.; GODBER, J. P. Food Phosphates. In THORNGATE, J. H.; SALMINEN, S.; BRANEN, L. A.; DAVIDSON, M. P. **Food Additives**, CRC Press, cap. 25. 2001.
- LEE, S. K.; ANEMA, S. G. The effect of the pH at cooking on the properties of processed cheese spreads containing whey proteins. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1373-1380, 2009.
- LEE, S. K.; ANEMA, S. G.; KLOSTERMEYER, H. The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 763-771, 2004.
- LEE, S. K.; BUWALDA, R. J.; EUSTON, S. R.; FOEGEDING, E. A.; McKENNA, A. B. Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, v.36, p. 339–345, 2003.
- LEE, S.K., KLOSTERMEYER, H., SCHRADER, K. & BUCHHEIM, W. Rheological properties and microstructure of model processed cheese containing low molecular weight emulsifiers. **Nahrung/Food**, **40**, p. 189–194, 1996.
- LU, Y.; SHIRASHOJI, N.; LUCEY, J. A. Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts. **Journal of Food Science**. v.73, N. 8, p. 363-369, 2008.
- LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNE, D. S. Invited Review: Perspective on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2725-2743, 2003.
- MARCHESSEAU, S., GASTALDI, E., LAGAUDE, A. & CUQ, J.-L. Influence of pH on protein interactions and microstructure of processed cheese. **Journal of Dairy Science**, 80, p. 1483–1489, 1997.
- MAURER-ROTHMANN, A.; SCHEURER, G. **Stabilization of Milk Protein Systems A JOHA Guide**. Ludwigshafen: BK Giulini GmbH, p. 50 2005.
- McBEATH, T.M.; LOMBI, E.; McLAUGHILIN, M. J.; BUMANN, E. K. Polyphosphate-fertilizer solution stability with time, temperature, and pH. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde**, 170(3), 387-391; 2007.

- McMAHON, D.J. & OOMMEN, B.S. Supramolecular structure of the casein micelle. **Journal of Dairy Science**, 91, 1709–1721, 2008.
- METZGER, L.E.; BARBANO, D.M.; KINDSTEDT, P.S. Effect of milk preacidification on low fat mozzarella cheese: III. Post-melt chewiness and whiteness. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.6, 2001.
- MEYER, A. **Process cheese manufacture**. London: Food Trade Press, p. 360, 1973.
- 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, p. 3070-3078; 2005.
- MIZUNO, R.; LUCEY, J. A. Properties of milk protein gels formed by phosphates. **Journal of Dairy Science**. V. 90, p. 4524–4531, 2007.
- MOLINS, R.A. **Phosphates in Food**. CRC Press. Boca Raton, FL, 1991.
- MONIN, G. Recent methods for predicting quality of whole meat. **Meat Science**, v. 49, p. 231-243, 1998.
- MULSOW, B. B.; JAROS, D.; ROHM, H. Processed cheese and cheese analogues. In: **Structure of dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p. 210-235, 2007.
- NORONHA, N; DUGGAN, E; ZIEGLER, G.R; O’RIORDAN, E, D; O’SULLIVAN, M. Investigation of imitation cheese matrix development using light microscopy and NMR relaxometry. **International Dairy Journal** 18, p. 641–648, 2008.
- OLIVEIRA, J. S. **QUEIJO: Fundamentos Tecnológicos**. Campinas: Ícone, 1986. 146p.
- RAND, M.C.; GREENSBERG, A.E.; TARAS, M.J. (Eds.) Standard methods for examination of water and wastewater. 14a. ed. Washington: **American Public Health Association**, 1975. P.189-190.
- RICHARDSON, G.H. (Ed.) Standard methods for examination of dairy products. 15a. ed. Washington: **American Public Health Association**, p.340-342, 1985.
- RULLIERE, C.; PERENES, L.; SENOCQ D.; DODI, A.; MARCHESSEAU, S. Heat treatment effect on polyphosphate chain length in aqueous and calcium solutions. **Food Chemistry**. V. 134, p. 712-716, 2012.

- RULLIERE, C.; RONDEAU-MOURO, C.; RAOUCHE, S.; DUFRECHOU, M.; MARCHESSEAU, S. Studies of polyphosphate composition and their interaction with dairy matrices by ion chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. **International Dairy Journal**, v.28, p. 102-108, 2013.
- SÁDLÍKOVÁ, I.; BUŇKA, F.; BUDINSKÝ, P.; VOLDÁNOVÁ, B.; PAVLÍNEK, V.; HOZA, I. The effect of selected phosphate emulsifying salts on viscoelastic properties of processed cheese. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, v.43, p. 1220–1225, 2010.
- SCHÄR, W.; BOSSET, J.O. Chemical and physico-chemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. A review. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie – Food Science and Technology**, v. 35, p. 15-20, 2002.
- SHINTU, L., CALDARELLI, S., & FRANKE, B. M. Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy. **Meat science**, 76, 700–707, 2007.
- VAN DENDER, A. G. F.; GALLINA, D.A.; ZACARCHENCO, P. B. Características dos sais fundentes e seu papel na obtenção de queijos processados. In: VAN DENDER, A. G. F. (Ed.). **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: Tecnologia de fabricação, controle de processo e aspectos de mercado**. São Paulo: Setembro, cap. 2, p. 29, 56, 2014.
- WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3-6, p. 189-192, Mar, 1999.
- WEISEROVÁ, E., DOUDOVÁ, L., GALIOVÁ, L., ŽÁK, L., MICHÁLEK, J., JANIŠ, R. The effect of combinations of sodium phosphates in binary mixtures on selected texture parameters of processed cheese spreads. **International Dairy Journal**, 21, 979 – 986, 2011.