UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CAMPUS ALTO PARAOPEBA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL COM REDUZIDO TEOR DE SÓDIO E SUPLEMENTADO COM QUERCETINA E VITAMINA B_2 ENCAPSULADOS EM NANOESTRUTURAS DE β-LACTOGLOBULINA

BRUNNA D'ONOFRE COUTO

OURO BRANCO - MG

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAOPEBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNNA D'ONOFRE COUTO

PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL COM REDUZIDO TEOR DE SÓDIO E SUPLEMENTADO COM QUERCETINA E VITAMINA B_2 ENCAPSULADOS EM NANOESTRUTURAS DE β-LACTOGLOBULINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São João Del-Rei, como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre.

*Bolsista CAPES

Orientador:
Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

OURO BRANCO – MG
2020

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C1p

Couto, Brunna D'Onofre.
PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL COM REDUZIDO TEOR DE SÓDIO E SUPLEMENTADO COM QUERCETINA E VITAMINA B 2 ENCAPSULADOS EM NANOESTRUTURAS DE B LACTOGLOBULINA / Brunna D'Onofre Couto ; orientador Igor José Boggione Santos; coorientador Demian Patrick Fabiano. -- Ouro Branco, 2020.
101 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2020.

1. Nanoproteína. 2. Alimento funcional. 3. Propriedades técnico-funcionais. 4. Encapsulamento de bioativos. 5. Proteína do soro de leite. I. Santos, Igor José Boggione, orient. II. Fabiano, Demian Patrick, co-orient. III. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **BRUNNA** D'ONOFRE COUTO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 14 DE JULHO DE 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

PPGEQ-DEQBIO/UFSJ

Prof. Dr. Demian Pratrick Fabiano

PPGEQ-DEQUI/UFSJ

Profa. Dra. Daniela Leite Fabrino

DQBIO/UFSJ

Dra. Delaine Meireles Gouvêa Boggione

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **BRUNNA D'ONOFRE COUTO,** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 14 DE JULHO DE 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

PPGEQ-DEQBIO/UFSJ

Demian Patrick Fabiano

Prof. Dr. Demian Pratrick Fabiano

PPGEQ-DEQUI/UFSJ

Profa. Dra. Daniela Leite Fabrino

DQBIO/UFSJ

Dra. Delaine Meireles Gouvêa Boggione

Resumo

O consumo excessivo de sal pode levar a adversidades na saúde. Por isso, houve uma determinação da redução de sódio pelo Ministério da Saúde às indústrias. Assim, a indústria de laticínios busca alternativas promissoras para redução e/ou substituição do sódio, sem alterar a qualidade do produto final. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir o queijo tipo minas frescal suplementado com nanoestruturas de β-lactoglobulina (β-lg) com e sem bioativos - quercetina e vitamina B2 - visando à redução do teor de sódio e o melhoramento funcional do alimento. Os queijos foram produzidos via planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3, sendo as variáveis independentes as concentrações de NaCl, KCl e nanoestrutura de β-lg, com três repetições no ponto central. Posteriormente, foi realizado o melhoramento funcional do alimento via encapsulamento dos bioativos quercetina e vitamina B2. As nanoestruturas sintetizadas apresentaram tamanho médio de 109,95 ± 0,68 nm e índice de polidispersividade (PDI) de 0,4078 ± 0,0539. Armazenadas a 4°C por 60 dias, mantiveram os valores de tamanho e de potencial zeta (-18,1 ± 1,1 mV), caracterizando um sistema coloidal semi-estável. As nanoestruturas apresentaram propriedades espumante e emulsificante melhoradas quando comparadas à proteína em sua forma nativa. Foi possível realizar o encapsulamento dos bioativos quercetina e vitamina B2 à nanoestrutura de β-lg, apresentando 96,50% e 36,39% de eficiência, respectivamente. No queijo minas frescal produzido, as variáveis pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, firmeza, coesividade, elasticidade, dureza e mastigabilidade não foram significativas estatisticamente para o modelo, porém, quando comparados aos queijos isentos de nanoestrutura, apresentaram 60,12% de redução dos valores de ácido lático e 47,64% e 49,03% de incremento nos valores de firmeza superior e lateral, respectivamente. A condutividade e adesividade foram significativas estatisticamente, sendo o KCl e NaCl o fator de maior influência, respectivamente. Os queijos produzidos com nanoestrutura e bioativo não apresentaram alterações nas propriedades físico-químicas e de textura. É uma alternativa promissora à redução do NaCl, visto que a substituição de 50% de NaCl por KCl deste trabalho concomitantemente com a adição da nanoestrutura manteve as propriedades físico-químicas e reológica do produto.

Palavras-chaves: nanoproteína; proteína do soro de leite; alimento funcional; propriedades técnico-funcionais; encapsulamento de bioativos.

Abstract

Excessive consumption of salt can lead to health adversities. Therefore, there was a determination of sodium reduction by the Ministry of Health to the industries. Thus, the dairy industry seeks promising alternatives for reducing and / or replacing sodium, without changing the quality of the final product. Therefore, the objective of this work was to produce Minas fresh cheese supplemented with β-lactoglobulin (β-lg) nanostructures with and without bioactives - quercetin and vitamin B2 - reducing the sodium content and improving food functionally. The cheeses were recovered via central rotational composite design (DCCR) 2^3, with the independent variables being concentrations of NaCl, KCl and β-lg nanostructure, with three repetitions at the central point. Subsequently, the functional improvement of the food was carried out the encapsulation of the bioactive quercetin and vitamin B2. As synthesized nanostructures, average size of 109.95 ± 0.68 nm and polydispersity index (PDI) of 0.4078 ± 0.0539. Stored at 4 ° C for 60 days, they maintained the values of size and zeta potential (-18.1 ± 1.1 mV), featuring a semi-stable colloidal system. The nanostructures sparkling and emulsifying properties improved, when compared to protein in its native form. It was possible to encapsulate the bioactive quercetin and vitamin B2 to the β-lg nanostructure, such as 96.50% and 36.39% efficiency, respectively. In the Minas fresh cheese produced, the variables pH, total soluble solids, titratable acidity, firmness, cohesiveness, elasticity, hardness and chewability were not statistically relevant for the model, however, when compared to nanostructure-free cheeses, odd 60.12 % reduction in lactic acid values and 47.64% and 49.03% increase in upper and lateral firmness values, respectively. Conductivity and adhesiveness were statistically significant, with KCl and NaCl being the most influential factor, respectively. The cheeses available with nanostructure and bioactive are not transferred in physical-chemical and texture properties. It is a promising alternative to the reduction of NaCl, since the replacement of 50% of NaCl by KCl of this work concomitantly with the addition of the nanostructure maintained the physical-chemical and rheological properties of the product.

Keywords: nanoprotein; whey protein; functional food; technical-functional properties; encapsulation of bioactives.

Agradecimentos

Agradeço,

Primeiramente, a Deus, por me permitir chegar até aqui e por abençoar meu caminho.

À minha família, que se faz sempre presente e apoia meus projetos e sonhos.

Ao Philippe, por toda compreensão e auxílio nessa importante etapa de minha vida.

Aos meus amigos, pela ajuda ao longo do caminho. Em especial, agradeço ao Saymon, à Isabela e à Karen, que se mantiveram próximos e me prestando todo suporte.

Aos meus colegas de Iniciação Científica, Beatriz e Carlos, que fizeram toda diferença no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Igor Boggione, por sempre ser tão disposto e atencioso com o projeto e nossos resultados.

À UFSJ, por oferecer a estrutura para desenvolvimento dessa pesquisa.

À CAPES pelo auxílio financeiro e pelo incentivo ao desenvolvimento da ciência.

Ao Laboratório multiusário CiPharma da UFOP pelas medidas em NanoZeta Sizer e ao projeto “Asymmetric Flow Field Flow Fractionation” (FAPEMIG CDS – APQ 01510-14).

Ao Laboratório de Embalagens da UFSJ – Campus Sete Lagoas, pela utilização do texturômetro.

Ao CNPEM pela Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão realizada no Laboratório LNNano.

À Professora Daniela Fabrino pelo auxílio na captura das imagens via Microscopia Eletrônica de Transmissão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ..... **IX**

LISTA DE TABELAS ..... **XI**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS ..... **XIV**

1. INTRODUÇÃO **15**

2. OBJETIVOS **17**

2.1. OBJETIVO GERAL 17

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **18**

3.1. QUEIJO MINAS FRESCAL **18**

3.1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO 18

3.1.2. TEOR DE SÓDIO NOS QUEIJOS E A SAÚDE PÚBLICA 19

3.1.3. FUNÇÃO DO SÓDIO NOS QUEIJOS 20

3.1.4. SOLUÇÕES TECNOLÓGICAS PARA REDUÇÃO DO TEOR DE SÓDIO EM QUEIJOS 21

3.2. PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE 23

3.3. B-LACTOGLOBULINA 24

3.3.1. ESTRUTURA 284

3.3.2. APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS 26

3.4. NANOTECNOLOGIA E NANOESTRUTURAS 28

3.4.1. DEFINIÇÃO 28

3.4.2. APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS 28

3.4.3. SÍNTESE DE NANOESTRUTURAS DE PROTEÍNA 29

3.5. NUTRACÊUTICOS 32

3.5.1. DEFINIÇÃO 32

3.5.2. QUERCETINA 33

3.5.3. VITAMINA B_2 35

3.6. ENCAPSULAMENTO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS 36

4. MATERIAL E MÉTODOS **39**

4.1. MATERIAL 39

4.2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOESTRUTURA DE B-LACTOGLOBULINA . 39
4.2.1. ANÁLISE DE TAMANHO E MORFOLOGIA VIA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) 39
4.2.2. ESTABILIDADE NO TEMPO DE ARMAZENAMENTO A 4ºC 40
4.2.3. PROPRIEDADE ESPUMANTE DA NANOESTRUTURA DE B-LG 41
4.2.4. PROPRIEDADE EMULSIFICANTE DA NANOESTRUTURA DE B-LG 41
4.3. ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA E VITAMINA B_2 NA NANOESTRUTURA DE B-LG 42
4.4. PRODUÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL INCORPORADO COM A NANOESTRUTURA DE B-LACTOGLOBULINA 43
4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO COM E SEM NANOESTRUTURA DE B-LG .. 46
4.5.1. pH E SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS 46
4.5.2. CONDUTIVIDADE 46
4.5.3. ACIDEZ TITULÁVEL 46
4.6. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA DO QUEIJO 47
4.6.1. ANÁLISE DE FIRMEZA 47
4.6.2. ANÁLISE INSTRUMENTAL DO PERFIL DE TEXTURA (TPA) 47
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 47

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49

5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOESTRUTURA DE B-LACTOGLOBULINA . 49
5.1.1. ANÁLISE DE TAMANHO E MORFOLOGIA VIA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) 49
5.1.2. ESTABILIDADE NO TEMPO DE ARMAZENAMENTO A 4ºC 51
5.1.3. PROPRIEDADE ESPUMANTE DA NANOESTRUTURA DE B-LG 53
5.1.4. PROPRIEDADE EMULSIFICANTE DA NANOESTRUTURA DE B-LG 54
5.2. ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA E VITAMINA B_2 NA NANOESTRUTURA DE B-LG 55
5.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO QUEIJO COM E SEM NANOESTRUTURA DE B-LG 60
5.4. ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA DO QUEIJO 67
5.4.1. ANÁLISE DE FIRMEZA 69
5.4.2. ANÁLISE INSTRUMENTAL DO PERFIL DE TEXTURA (TPA) 71
5.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E DE TEXTURA DOS QUEIJOS COM ENCAPSULADOS 80

6. CONCLUSÕES **83**

7. PERSPECTIVAS **84**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **85**

APÊNDICE **95**

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da β-lg: (a) representando os oito filamentos das cadeias β; (b) representando o sítio de interação hidrofóbica no cálice, sendo a estrela azul, possíveis ligações de moléculas bioativas e as ligações entre cisteínas nas posições 160-66 e 106-119 (Adaptada de LOVEDAY; SAWYER, 2016) **25**

Figura 2. Demonstração gráfica do caminho na nanoestrutura de β-lg encapsulada com bioativo no organismo humano, sendo somente degradada no intestino (Adaptada de SHAFAEI *et al.*, 2017). **27**

Figura 3. Preparação de nanoestruturas de proteína por dessolvatação, aplicando o álcool etílico (Adaptada de TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017) **30**

Figura 4. Preparação de nanoestruturas de proteína em meio salino com alteração de pH (Adaptada de TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017) **31**

Figura 5. Estrutura química da quercetina (D'ANDREA, 2015) **34**

Figura 6. Estrutura química da vitamina B_2 oxidada e reduzida, respectivamente (NOHR; BIESALSKI; BACK, 2002). **35**

Figura 7. Fluxograma da produção do Queijo Minas Frescal com e sem nanoestrutura de β-lg **46**

Figura 8. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoestruturas de β-lg com 200 nm de escala utilizando o método de *negative stain* para o preparo da amostra (A) e (B) **50**

Figura 9. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoestruturas de β-lg com 200 nm de escala utilizando o método de crioscopia para o preparo da amostra (A) e (B) **50**

Figura 10. Gráfico de Paretto para condutividade elétrica do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg **65**

Figura 11. Superfície de resposta do DCCR de três fatores com a variável dependente condutividade elétrica em função da variável codificada (a) concentração de NaCl e KCl; (b)

concentração de KCl e da nanoestrutura de β-lg*;* (c) concentração NaCl e da nanoestrutura de β-lg..... **67**

Figura 12. Gráfico de Paretto para adesividade do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg..... **75**

Figura 13. Superfície de resposta do DCCR de três fatores com a variável dependente adesividade em função da variável codificada (a) concentração de NaCl e KCl; (b) concentração de KCl e da nanoestrutura de β-lg*;* (c) concentração NaCl e da nanoestrutura de β-lg..... **77**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Ingestão máxima de sódio por dia para adultos em diferentes países (Adaptada de FERRÃO, 2016). **20**

Tabela 2. Propriedades físicas e bioquímicas das principais proteínas do soro de leite (Adaptada de PEREIRA, 2009). **23**

Tabela 3. Classificação dos Nutracêuticos (Adaptado de DUDEJA; GUPTA, 2017) **33**

Tabela 4. Preparação de diferentes concentrações de quercetina [Q]* em nanoproteína de β-lg para determinar a eficiência de encapsulação **43**

Tabela 5. Preparação de diferentes concentrações de vitamina B_2 [V]* em nanoproteína de β-lg para determinar a eficiência de encapsulação **43**

Tabela 6. Planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3, sendo 8 experimentos em 2 níveis, totalizando 17 ensaios, com 6 experimentos nos pontos axiais e 3 repeticões no ponto central tendo como variáveis independentes as concentrações de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e da nanoproteína β-lg **44**

Tabela 7. Matriz dos limites das variáveis: NaCl ($g.L^{-1}$), KCl ($g.L^{-1}$) e nanoestrutura de β-lg ($mg.kg^{-1}$) **44**

Tabela 8. Preparação de diferentes queijos controle (sem nanoestrutura) **45**

Tabela 9. Teste de estabilidade sob armazenamento a 4ºC da nanoestrutura de β-lg, sendo medidos Potencial Zeta (mV), Tamanho (nm) e PDI nos dias 0, 5, 10, 15, 30 e 60 após a síntese. **52**

Tabela 10. Valores de incremento de volume (VI) e estabilidade de espuma (FS) para a proteína nativa e para nanoestrutura de β-lg nos tempos 30, 60 e 120 minutos **54**

Tabela 11. Valores de IAE e ESI para a proteína nativa e para nanoestrutura de β-lg **55**

Tabela 12. Valores de Eficiência de Encapsulação (EE %) e Capacidade de Ligação (LC) da quercetina na nanoestrutura de β-lg **56**

Tabela 13. Valores de Eficiência de Encapsulação (EE %) e Capacidade de Ligação (LC) da vitamina B_2 na nanoestrutura de β-lg **57**

Tabela 14. Propriedade físico-química pH dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg **60**

Tabela 15. Propriedade físico-química ºBrix dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg **61**

Tabela 16. Propriedade físico-química acidez titulável (%) dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg **62**

Tabela 17. Propriedade físico-química condutividade elétrica ($mS.cm^{-1}$) dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg **64**

Tabela 18. ANOVA da variável resposta condutividade elétrica do DCCR do queijo com nanoestrutura de β-lg **66**

Tabela 19. Perfil médio de textura instrumental a partir da análise de firmeza lateral e superior dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg **69**

Tabela 20. Análise Instrumental de Textura dos queijos com diferentes concentrações de nanoestruturas de β-lg, NaCl e KCl, seguindo o DCCR, em função das variáveis de resposta Coesividade, Adesividade (g.s), Elasticidade, Mastigabilidade (N), Dureza (N) **71**

Tabela 21. Análise Instrumental de Textura dos queijos controle – isentos da nanoestrutura de β-lg, em função das variáveis de resposta Coesividade, Adesividade (g.s), Elasticidade, Mastigabilidade (N), Dureza (N) **72**

Tabela 22. ANOVA da variável resposta adesividade do DCCR do queijo com nanoestrutura de β-lg **76**

Tabela 23. Análises físico-químicas dos queijos com nanoencapsulados de quercetina; de vitamina B_2 e controle – isento de bioativo, em função de pH, sólidos solúveis totais (ºBrix), acidez titulável (%), condutividade ($mS.cm^{-1}$) **80**

Tabela 24. Perfil médio de textura instrumental a partir da análise de firmeza lateral e superior dos queijos com nanoencapsulados de quercetina; de vitamina B_2 e controle – isento de bioativo **81**

Tabela 25. Análise Instrumental de Textura dos queijos com nanoencapsulados de quercetina; de vitamina B_2 e controle – isento de bioativo, em função das variáveis de resposta Coesividade, Adesividade (g.s), Elasticidade, Mastigabilidade (N), Dureza (N) **82**

Lista de Abreviaturas e Símbolos

β-lg – Proteína β-lactoglobulina

Da – Dalton

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

GRAS – Geralmente Reconhecido como Seguro

KCl – Cloreto de Potássio

Na - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

PDI - Índice de Polidispersividade

1. INTRODUÇÃO

Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil e grande parte deste leite é destinada a produção de diferentes tipos de queijo (EMBRAPA, 2015). Um em cada três litros de leite produzidos no Brasil é destinado para a produção de queijos, os quais estão entre os produtos lácteos mais apreciados. Segundo estudos da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (Abiq), há mais de 70 tipos de queijos de produção nacional à disposição dos consumidores. Em 2017, a produção de queijos atingiu 1 milhão de toneladas, com crescimento de 2% sobre o ano anterior (EMBRAPA, 2018).

O brasileiro consome em torno de 5,5 kg de queijo por ano. Os destaques nacionais são a muçarela, equivalendo a 30% do mercado, seguida do queijo prato (20%), do requeijão (8%) e do minas frescal (6%). Ainda segundo estimativas, o mercado brasileiro de queijo movimenta cerca de R$ 18 bilhões por ano. No panorama geral, o Brasil possui aproximadamente dois mil laticínios, sendo que 10% desse total respondem por cerca de 80% da produção de queijos (EMBRAPA, 2018).

Uma característica relevante é que os queijos estão entre os alimentos processados industrialmente com maior teor de sódio. Por exemplo, o Minas Frescal, em 2014, apresentou uma média de 444 mg de sódio por porção de 100 g (ANVISA, 2015). Porém, o consumo excessivo de sódio gera adversidades na saúde, como a constante elevação da pressão arterial, aumentando o risco de doenças cardiovasculares, que são atualmente as principais causas de mortalidade no Brasil e no mundo (SOUZA, 2016). Ainda é relevante destacar que, segundo o Ministério da Saúde, o brasileiro ingere o dobro de sódio por dia, quando comparado ao valor estipulado pela Organização Mundial de Saúde.

Dessa forma, o Ministério da Saúde tem organizado estratégias e acordos com associações do setor produtivo, a fim de reduzir gradativamente os elevados índices de sódio em produtos processados. Em 2010, foi renovado o termo de compromisso que traz, entre outros objetivos, a redução de sódio nesses alimentos, visando a adequação dos níveis de consumo em até 2 g/dia/pessoa até o ano de 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; SOUZA, 2016).

Levando em conta esta exigência dos órgãos de saúde pública, é necessário que os produtores de queijo comecem a adaptar a produção para reduzir este teor de sódio no

produto. Porém, a grande dificuldade está no fato de que o sal, amplamente usado durante todo o preparo do queijo, está ligado a importantes características organolépticas, como textura e sabor. No queijo Minas Frescal, este ingrediente também está relacionado à preservação do produto, devido ao elevado teor de umidade apresentado pelo mesmo, que varia entre 55 a 58% (SOARES, 2013).

Diante deste desafio, a nanotecnologia se destaca como alternativa promissora tanto para a redução de sódio quanto para o desenvolvimento de alimentos funcionais via nanoestruturas carreadoras de moléculas bioativas (LIVNEY, 2015; BRANDELLI; BRUM; DOS SANTOS, 2017).

A β-lactoglobulina (β-lg), presente no soro do leite obtido na fabricação do queijo, é uma proteína passível de ser nanoestruturada para aplicação em alimentos, uma vez que a sua nanoestruturação possui o potencial de amplificar as suas propriedades técnico-funcionais, como capacidade de emulsificação, formação de espumas, gelificação e interação com moléculas responsáveis pelo aroma e sabor do produto (ALVES *et al.*, 2008).

Além disso, os consumidores têm buscado cada vez mais alimentos saudáveis e que permitam não somente a nutrição, mas a prevenção ou o tratamento de doenças. Tais alimentos são denominados de nutracêuticos (SHOJI; NAKASHIMA, 2004). Dois nutracêuticos de grande importância são a quercetina e a vitamina B_2.

A quercetina é caracterizada como um flavonoide, de massa molar de 302,2 $g \cdot mol^{-1}$, estando presente em vários vegetais e alimentos processados. Suas atividades biológicas são antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, antiplaquetária, antimicrobiana, antineurodegenerativa, antitumoral e antiviral (HARWOOD *et al.*, 2007). Já a vitamina B_2 é uma flavina hidrossolúvel, que está presente em células de animais e vegetais, como em farelo de trigo, leite e derivados lácteos, ovos, carnes e vegetais. O corpo humano é incapaz de produzi-la, logo a mesma deve ser ingerida através de alimentos para atingir os níveis necessários ao metabolismo (MACK; GRILL, 2006).

Portanto, neste trabalho foi realizado o estudo e caracterização das propriedades físico-químicas e de textura do queijo Minas Frescal artesanal reduzido em teor de sódio e incorporado com nanoestruturas de β-lg com os bioativos quercetina e vitamina B_2 encapsulados, a fim de melhorar as propriedades funcionais do alimento, sem alterar a qualidade e textura do queijo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar o queijo minas frescal artesanal, incorporado com nanoestruturas de β-lg com quercetina e vitamina B_2 encapsuladas em sua estrutura, avaliando as propriedades físico-químicas e de textura do produto, com foco na redução do teor de sódio e melhoramento funcional do alimento.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar morfologicamente a nanoestrutura de β-lg via Microscopia Eletrônica de Transmissão.
- Avaliar a estabilidade da nanoestrutura de β-lg em armazenamento a 4ºC por 60 dias, via medição de tamanho, PDI e potencial zeta.
- Obter e caracterizar os encapsulados de quercetina e vitamina B_2 na nanoestrutura de β-lg.
- Produzir o queijo minas frescal incorporado com a nanoestrutura de β-lg pura.
- Produzir o queijo minas frescal incorporado com a nanoestrutura de β-lg com quercetina ou com vitamina B_2 encapsuladas.
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de NaCl, KCl e nanoestrutura de β-lg nos queijos minas frescal obtidos via planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR).
- Caracterizar os queijos produzidos em função das propriedades físico-químicas: pH, sólidos solúveis totais, condutividade elétrica e acidez titulável; e propriedades mecânicas: firmeza, coesividade, elasticidade, adesividade, dureza e mastigabilidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Queijo minas frescal

3.1.1. Caracterização do produto

O leite é um fluido originado da secreção da glândula mamária de mamíferos. Apresenta rica composição nutricional, sendo considerado um alimento completo e de grande importância na alimentação infantil humana e na das criações de animais (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Outra característica inerente ao leite é sua alta perecibilidade, que pode ser: química, quando é causada pelos efeitos da oxidação, ou biológica, quando há a atuação de microrganismos (SILVA, 2005).

O leite é uma matéria prima primordial na indústria de alimentos, sendo processado em uma série de derivados. Entre os quais, o queijo é um dos principais produtos. Um em cada três litros de leite produzidos no Brasil é destinado para a produção de queijos, os quais possuem alta demanda de consumo (EMBRAPA, 2015). Esse produto é caracterizado como um concentrado proteico-gorduroso, obtido através da coagulação do leite e retirada do soro (SILVA, 2005).

Os queijos são alimentos altamente nutritivos e fontes de cálcio, fósforo e proteínas. Uma dieta balanceada, que inclua os queijos, juntamente com hábitos de vida saudáveis conferem benefícios, como redução dos sinais de intolerância à lactose e risco de câncer de cólon, proteção contra infecções e melhoria da evacuação intestinal (FERRÃO *et al*., 2016).

O queijo minas frescal está entre os queijos mais consumidos no mercado brasileiro, por isso, é produzido em larga escala e está presente em um grande número de receitas, como café da manhã e sobremesas (GOMES *et al.*, 2011).

Este queijo tem essa denominação por ser uma variedade não maturada, de consumo imediato e alta perecibilidade. É obtido através da coagulação enzimática do leite, que pode ser feita com o próprio coalho comercial ou com outras enzimas coagulantes adequadas. Essa etapa de coagulação ainda pode ser suplementada via fermentação por bactérias lácticas específicas (SILVA, 2005). O processo de fabricação do queijo minas tipo frescal é simples e com baixo custo, além disso, apresenta alto rendimento, sendo comercializado a um preço acessível (SOARES, 2013).

O queijo minas frescal industrializado é caracterizado por uma massa crua, que possui coloração branca, de consistência macia e textura fechada. Sua composição nutricional apresenta, em média, 55% a 58% de umidade e 17% a 19% de gordura; o teor de sal pode variar entre 1,4% e 1,6%; e o pH entre 5,0 e 5,3 (SILVA, 2005).

3.1.2. Teor de sódio nos queijos e a saúde pública

Os queijos, incluindo o tipo minas frescal, possuem elevados teores de sódio (Cloreto de Sódio – NaCl) e gordura (FOULADKHAH; BERLIN, 2015). O sódio é essencial para as funções metabólicas do organismo humano (DOYLE; GLASS, 2010). Porém, quando é altamente consumido, contribui para o aumento de casos de hipertensão, doenças e cálculos renais, câncer de estômago, além de aumentar a excreção de cálcio na urina, favorecendo a osteoporose (CRUZ *et al*., 2011). Por isso, órgãos responsáveis pelas políticas de saúde pública em todo o mundo voltaram o foco para redução desses nos processos produtivos, visando à prevenção de doenças e o atendimento da demanda dos consumidores por produtos benéficos à saúde (FERRÃO *et al*., 2016).

A hipertensão representa uma carga significativa no que diz respeito à qualidade de vida e recursos do sistema de saúde. É uma das grandes causas de mortalidade no mundo e agrava o risco de doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, angina pectoris, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral (FERRÃO *et al*., 2016).

Diante desse cenário preocupante, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estipulou a ingestão máxima de 2 (duas) gramas diária de sódio por pessoa (OMS, 2011). Na Tabela 1, são apresentados os limites de ingestão de sódio permitidos em diferentes países. No entanto, o cenário brasileiro é mais crítico, estima-se que são consumidos diariamentente mais que 5 (cinco) gramas de sal por pessoa (IDEC, 2014). A alta ingestão de sódio é diretamente relacionada ao consumo dos alimentos processados. Os queijos despontam como o quarto maior influenciador no consumo de sódio pelos brasileiros (BUENO COSTA *et al*., 2018).

Tabela 1. Ingestão máxima de sódio por dia para adultos em diferentes países (Adaptada de FERRÃO, 2016)

Região	Ingestão máxima diária de sódio ($g.dia^{-1}$)
Estados Unidos	< 2,3
Canadá	< 2,3, sendo a ideal < 1,5
União Europeia	< 5
Mercosul	< 2,4
Brasil	≤ 5,0

Segundo o Ministério da Saúde é estimado que sejam retiradas 28 mil toneladas de sódio dos alimentos brasileiros até 2020 (FERRÃO *et al*., 2016). Novas legislações entrarão em vigor a partir do referido ano. Dentro da indústria de laticínios, a meta de redução é de 63% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012), demonstrando que há grandes desafios a serem superados pelo setor industrial. Portanto, se fazem necessárias alternativas e novas tecnologias que auxiliem nessa problemática.

3.1.3. Função do sódio nos queijos

O sódio exerce funções importantes nos alimentos, como o realce de sabor e aroma e conservação do produto. Nos queijos, este componente atua como agente emulsificante e redutor da atividade de água e atividade microbiana. Assim, ao reduzir o teor de sódio se faz necessário acrescentar outros aditivos, que sejam seguros para os alimentos e que mantenha suas características de sabor, textura e qualidade (TAORMINA, 2010).

A inibição da atividade antimicrobiana é um fator muito importante, principalmente nos queijos frescos, que são mais susceptíveis a essa contaminação. O sódio inativa os microrganismos pela redução da atividade da água, mas também por interferir no processo de transferência de massa, aumentando a pressão osmótica do meio, o que gera a desidratação das bactérias e, consequentemente, sua destruição e inibição de crescimento (GUINEE; FOX, 2004).

O teor de sódio também é importante na solubilidade das proteínas do queijo, visto que é um agente regulador da força iônica. Portanto, permite a hidratação das proteínas, o que influencia diretamente na estrutura, na estabilidade, na reologia e na textura do produto (CRUZ *et al.*, 2011).

Além disso, o sódio influencia na velocidade da proteólise no queijo, alterando a agregação de moléculas e substratos. É capaz de interferir diretamente na atividade das enzimas envolvidas no processo produtivo (KATSIARI *et al*., 2000). Por exemplo, a quimosina, enzima em maior concentração no coalho, é influenciada pela concentração de sódio, sendo que, em concentrações muito baixas desse sal, o processo de coagulação é retardado (SOARES, 2013).

O sódio é um agente significante nas propriedades físico-químicas dos queijos, principalmente na reologia e textura. Sendo comprovado que, os queijos com teores de sódio medianos apresentam textura firme, como *feta* e *brie*; os com baixos teores de sódio são mais cremosos, como a ricota e o *cottage*; e os com maiores teores de sódio são mais duros, como o *cheddar* e *gouda* (GUINEE; FOX, 2004). O que é um fator muito importante, visto que a textura do queijo está diretamente relacionada à sua qualidade, identidade e à sua aceitação pelo consumidor (ALVARENGA, 2008).

3.1.4. Soluções tecnológicas para redução do teor de sódio em queijos

A redução do teor de sódio nos queijos é um fator preocupante, visto que interfere nas propriedades funcionais desse alimento (FELICIO *et al*., 2013). Por isso, pesquisas voltadas para a substituição desse componente são de relevante importância.

Geralmente, para solucionar esta questão é feita a redução do NaCl ou a substituição deste por um outro sal, o que pode ocasionar uma série de problemas no processo produtivo, resultando em mudanças físico-químicas, reológicas, funcionais e sensoriais do produto (FELICIO *et al*., 2016)

A primeira solução tecnológica proposta foi a redução da quantidade de sódio no processo produtivo. No estudo de Lindsay e colaboradores (1982) foi demonstrado que a redução de sódio de 4,9% a 3,5% no queijo Cheddar não afetou de forma intensa as características do produto, porém, no teste com consumidores, estes optaram pelo queijo com maior teor de sódio. Já no estudo Wyatt (1983), a redução de 35% na quantidade de sódio do queijo fresco Cottage não influenciou na avaliação pelos consumidores; porém ao aumentar a redução para 50% houve baixa aceitação.

Com o desenvolvimento de pesquisas, a alternativa tecnológica mais comumente aplicada é a substituição parcial do NaCl pelo cloreto de potássio (KCl), visto que este

mantem o sabor e permite a redução do NaCl, sem comprometer as características finais do produto (GOMES *et al*., 2011; CRUZ *et al*., 2011). A ingestão de KCl na dieta não apresenta efeito na hipertensão, o que acontece com o sódio (BUENO COSTA *et al*., 2018). Por esses motivos, o KCl é aplicado como objeto de estudo deste trabalho.

Em um estudo recente de Chavhan e colaboradores (2015), foi alcançada a redução de 27% de sódio no queijo muçarela, através da substituição parcial do NaCl por KCl. Foi também aplicada uma mistura de sais de potássio – citrato de potássio e fosfato dipotássico - para melhoria da emulsificação. O queijo muçarela ficou com formulação final de 30,96% de KCl e 2% da solução emulsificante, sem interferir nas qualidades físico-químicas e sensoriais.

Já no trabalho de Bueno Costa e colaboradores (2018), foi possível obter uma significante redução no teor de sódio do queijo minas padrão pela substituição parcial do NaCl por KCl, nas porcentagens de 25 e 50%. Os queijos com KCl 25% e 50% apresentaram cerca de 369,12 mg e 210,05 mg de sódio, respectivamente, enquanto o controle (100% NaCl) apresentou 608,67 mg. No teste de aceitação, não houve diferenças significativas para o queijo com 25% de cloreto de potássio, quando comparado com o controle. Ao aumentar a porcentagem para 50%, houve leve rejeição, por mudança no sabor, o que pode ter ocorrido pela redução de pH e sinérese, diminuindo o teor de umidade. Além do que, o perfil de ácidos graxos foi afetado pela redução de sódio, com aumento de cadeia curta, cadeia média e ácidos graxos poli-insaturados, os quais também influenciam no sabor do produto.

Maior sucesso na redução do sódio foi obtido no queijo minas frescal, no qual, Gomes e colaboradores (2011) conseguiram, através da substituição parcial apenas de 25% do NaCl por KCl, uma redução de 51,8% na concentração de sódio. Foi feito o teste com consumidores e o queijo com baixo teor de sódio foi aceitável. Com isso, nota-se a possibilidade de aplicação desta tecnologia no queijo minas frescal com eficiência, podendo ser testados valores ainda maiores de substituição, assim como foi feito neste trabalho, conforme relatado no Material e Métodos.

Diante dos impasses destas metodologias, a nanotecnologia se destaca como uma possível alternativa na otimização da funcionalidade dos alimentos (LIVNEY, 2015), principalmente, por sua grande variedade de aplicações (BRANDELLI; BRUM, 2017) e, por isto, foi utilizada neste trabalho, como um potencial inovador para a produção do queijo tipo

minas frescal, suplementado com nanoestruturas de β-lg, que é a proteína mais abundante do soro de leite.

3.2. Proteínas do soro de leite

O soro de leite é um composto líquido, rico em nutrientes e derivado da produção de queijos e caseína, é composto por água (95%), lactose (3,5%), proteínas (0,5%), sais minerais, vitaminas e ácido láctico (1,0%). Suas proteínas possuem alto valor nutricional, principalmente, pelas características de sua composição, biodisponibilidade de aminoácidos essenciais e alta digestibilidade. Além disso, suas propriedades de formação e estabilização de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes, as tornam altamente importantes para as indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos (SGARBIERI, 2005; PRAZERES; CARVALHO, 2012).

As proteínas presentes no soro de leite são amplamente estudadas, a fim de identificar suas propriedades físico-químicas, propriedades funcionais e estruturais, podendo encontrar novas aplicações para estes compostos. Essas proteínas são divididas em dois grupos: proteínas de maior e menor concentração. As de maiores concentrações são a α-lactoalbumina (25%) e β-lg (55%), as quais são proteínas globulares, que possuem baixa massa molar e representam 80% de todas as proteínas do soro. Já as de menores concentrações são a soro albumina bovina, a lactoferrina, as imunoglobulinas, as fosfoliproteínas e outros fatores bioativos e enzimas relatadas na Tabela 2 (ANTUNES, 2003; PEREIRA, 2009).

Tabela 2. Propriedades físicas e bioquímicas das principais proteínas do soro de leite (Adaptado de PEREIRA, 2009)

Proteína	Massa molar (kDa)	Ponto isoelétrico	Concentração ($g.L^{-1}$)
β-lactoglobulina	18,4	5,2	2,70
α-lactoalbumina	14,15	4,2 - 4,8	1,20
Soro albumina bovina	69	4,7 - 4,9	0,4
Imunoglobulina	15 -1000	5,5 -8,3	0,65
Lactoferrina	78	8,0-9,0	0,1
Lactoperoxidase	89	9,5	0,02

Nota-se que β-lactoglobulina é a proteína com maior concentração no soro do leite, sendo viável o estudo de suas aplicações. Essas proteínas, por possuírem inúmeras

propriedades funcionais e nutricionais, exercem influência no processo de transformar o soro em um produto altamente aplicado na biotecnologia, tanto em agroindústrias, como na medicina, na indústria alimentícia e como suprimento para crescimento de culturas microbiológicas (FIDELIS, 2011).

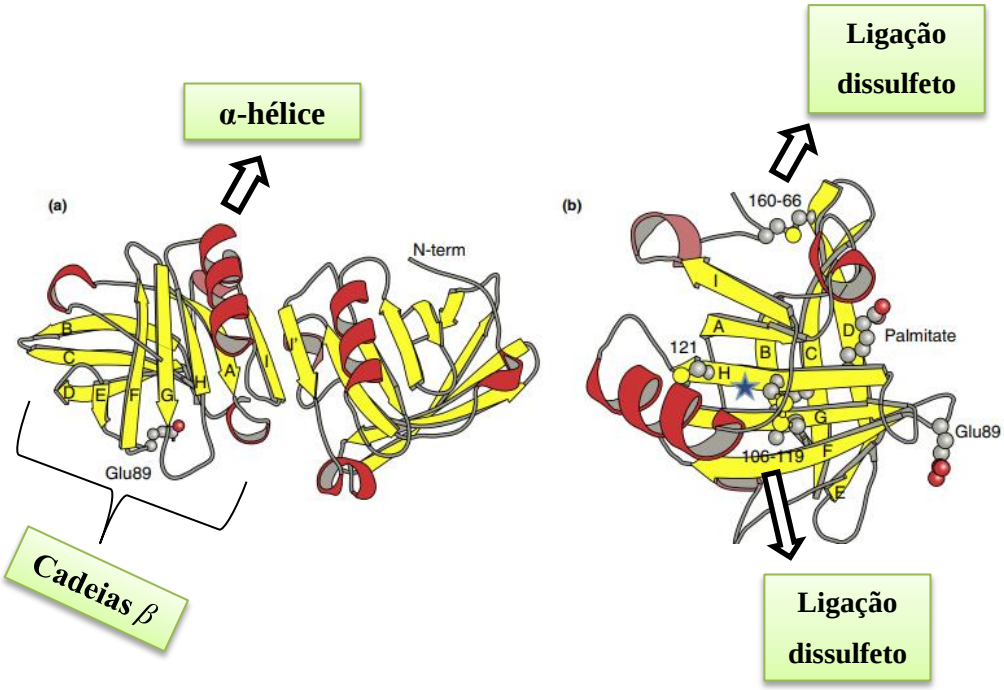
3.3. β-lactoglobulina

3.3.1. Estrutura

Como dito anteriormente, a β-lactglobulina é uma proteína presente no soro de leite, de forma globular, tamanho pequeno e solúvel. Apresenta-se na forma de monômero com 18 kDa em pH 3 e apresenta 162 resíduos de aminoácidos. Já em pH entre 3 e 7, geralmente o pH dos queijos, é encontrada na forma de dímero, com 36 kDa, sendo resistente às condições ácidas (CHATTERTON *et al*., 2006).

A estrutura secundária da β-lg apresenta nove cadeias β e somente uma α-hélice, conforme demonstrado na Figura 1. Dessas cadeias β, oito se posicionam para dentro da estrutura, formando o cálice, o qual é de conformação cônica e possui duas superfícies distintas. Uma dessas superfícies apresenta os filamentos de A a D e a outra os de E a H. O filamento I é o principal responsável pelas interações da β-lg com outras moléculas. Além disso, o interior do cálice é o principal local de ligações hidrofóbicas (LOVEDAY; SAWYER, 2016). Os parâmentros dessas interações dependem da natureza química do ligante, das condições físico-químicas que ligante e proteína estão sujeitos e da conformação proteica. A ligação da β-lg com ligantes pode levar a alterações em sua estrutura (TAVARES *et al*., 2014).

Figura 1. Estrutura da β-lg: (a) representando os oito filamentos das cadeias β; (b) representando o sítio de interação hidrofóbica no cálice, sendo a estrela azul, possíveis ligações de moléculas bioativas e as ligações entre cisteínas nas posições 160-66 e 106-119 (Adaptada de LOVEDAY; SAWYER, 2016)



Os filamentos de A a H das cadeias β são conectados por um total de sete alças, denominadas AB, BC, CD, DE, EF, FG e GD. Dessas, as alças BC, DE e FG são de tamanho curto e ficam próximas da parte mais fechada do cálice. Já as demais alças são longas e flexíveis, ficando próximas à extremidade aberta do cálice. A alça EF forma um *loop* que é responsável pelo sítio de ligação desse cálice. São encontradas na estrutura dessa proteína cinco cisteínas nas posições 66, 106, 119, 121 e 160, que formam duas ligações dissulfeto entre 66-160 e 106-119, resultando em um grupo tiol livre dependende do pH do meio e que é o responsável pela agregação ou desnaturação da β-lg (SHAFAEI *et al*., 2017). A β-lg também possui resíduos de triptofano (posições 19 e 61), sendo que o triptofano 19 confere a essa proteína intensidade de fluorescência (MARSHALL, 2004).

A β-lg possui uma quantidade relevante de aminoácidos que exercem papéis importantes na nutrição humana, que são leucina, isoleucina, valina, fenialanina, tirosina, metionina, triptofano, lisina e histidina, essenciais para a preservação dos tecidos (MARSHALL, 2004).

3.3.2. Aplicações na indústria de alimentos

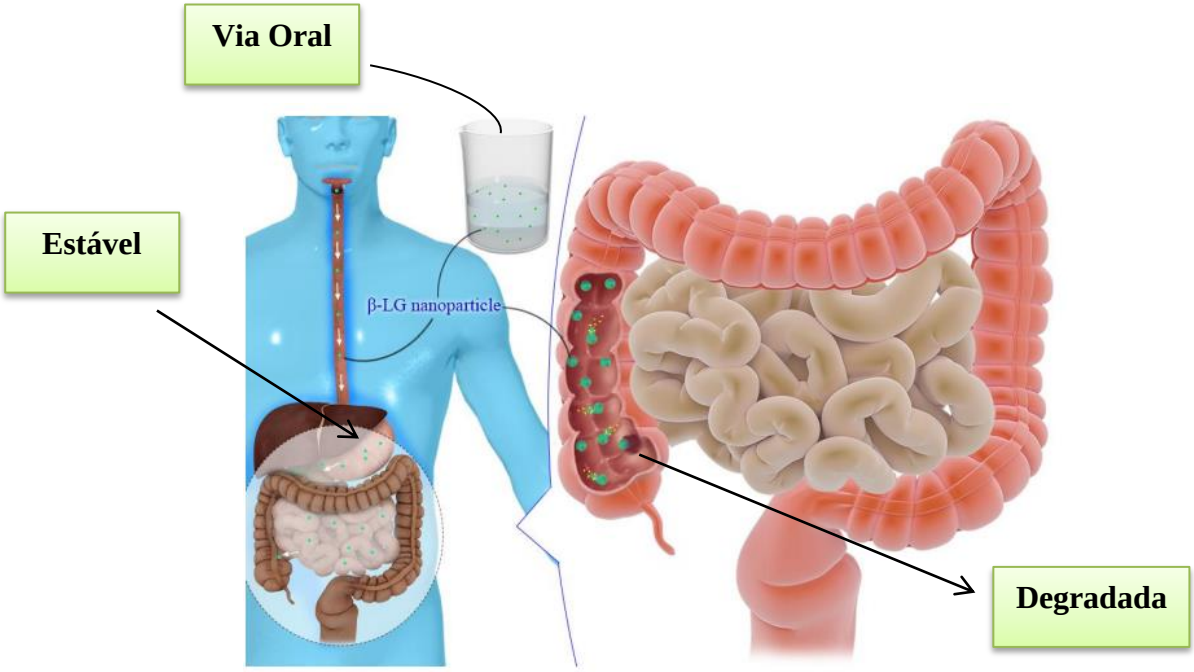
A β-lg, por suas diversas funcionalidades nutricionais, é um ingrediente cotado na formulação de novos alimentos. Por sua estrutura complexa, tem atraído a atenção de pesquisadores que buscam explorar cada vez mais suas bioatividades (CHATTERTON *et al*., 2006).

A β-lg possui uma característica muito interessante de geleificação, que pode ser ajustada pelo calor (HOLT, 2000), podendo ser aplicada em alimentos, nos quais a ligação com a água e a texturização são necessárias, como nos queijos. Os géis formados por essa proteína podem ser manipulados através de alterações do pH, força iônica e temperatura durante a gelificação (DUFOUR *et al*., 1998). Logo, podem ser formados géis opacos ou translúcidos, mais flexíveis ou mais rígidos, aumentando a gama de aplicação da β-lg em diferentes processos da indústria alimentícia.

A β-lg também tem capacidade de formação de espuma e possui estabilidade térmica equivalente à clara de ovo, podendo ser um substituto econômico e viável para outros ingredientes. As propriedades espumantes dessa proteína são de alto desempenho, sendo solúvel e estável em uma ampla faixa de pH e até mesmo em altas temperaturas (CHATTERTON *et al*., 2006).

Além de suas variáveis características funcionais, a β-lg é resistente à degradação pela pepsina no estômago (CHEN; SUBIRADI, 2006) e quimotripsina do pâncreas, devido à sua estrutura molecular complexa e estável (ANTUNES, 2003), a qual é otimizada na sua forma nanoestruturada, sendo ainda mais resistente e podendo ser aplicada no carregamento de bioativos e no aumento da biodisponibilidade deles, conforme Figura 2.

Figura 2. Demonstração gráfica do caminho na nanoestrutura de β-lg encapsulada com bioativo no organismo humano, sendo administrada via oral e somente degradada no intestino (Adaptada de SHAFAEI *et al*., 2017)



No trabalho de Madalena e colaboradores (2016), a nanoestrutura de β-lg com riboflavina encapsulada foi testada *in vitro* quanto a resistência ao pH do estômago e intestino, utilizando meios sintéticos com enzimas. Para isso, foi utilizado um reator de parede dupla, para manter a temperatura a 37ºC, com 10 cm de diâmetro interno e 15 cm de altura. As fases digestivas simuladas foram: estômago, aplicando solução de pepsina e lipase com fluxo de 0,3 $mL.min^{-1}$ por 2 horas, com mudança de pH de 4,8 para 1,7, utilizando solução de HCl a 1 $mol.L^{-1}$; duodeno, aplicando solução de extrato biliar suíno e pancreatina com fluxo de 0,6 $mL.min^{-1}$ por 1 hora, com mudança de pH para 6,5, utilizando solução de bicarbonato de sódio 1 $mol.L^{-1}$; jejuno, aplicando solução de extrato biliar suíno com fluxo de 2,1 $mL.min^{-1}$ por 1 hora, com mudança de pH para 6,8, utilizando solução de bicarbonato de sódio 1 $mol.L^{-1}$; ileum, aplicando somente solução de bicarbonato de sódio 1 $mol.L^{-1}$ com fluxo de 2,0 $mL.min^{-1}$ por 1 hora, com mudança de pH para 7,2. A nanoestrutura com bioativo foi degradada somente no intestino delgado, devido à ação de sais biliares, se mostrando um excelente meio carreador desse bioativo, visto que foi resistente à ação de pH mais ácidos e enzimas digestivas. Não se tem, até o momento, estudos *in vivo* da digestão da nanoestrutura de β-lg na literatura.

3.4. Nanotecnologia e Nanoestruturas

3.4.1. Definição

A denominação “nanotecnologia” foi introduzida em 1974 por Norio Taniguchi no campo dos materiais aplicados em escala nanométrica (TANIGUCHI, 1974). Segundo o Dicionário de Oxford, nanotecnologia é a tecnologia que trabalha com dimensões entre 1 a 100 nanômetros ou que, geralmente, trabalha com a manipulação de moléculas ou átomos individuais. É a tecnologia aplicada na engenharia e controle da matéria para que tenham propriedades únicas e novas aplicações (SHAFAEI *et al*., 2017).

Nesse sentido, o crescente interesse na nanotecnologia deve-se ao potencial das nanoestruturas apresentarem propriedades novas, diferentes das que o material apresentava na forma original e, com isso, é possível o desenvolvimento de produtos e processos otimizados e/ou inovadores (GUPTA, 2011).

Os materiais nanoestruturados podem ser obtidos em diferentes dimensões através de seus elementos estruturais, aglomerados, moléculas ou cristalitos. Assim, podem ser classificados como: dimensões zero, que incluem as nanoestruturas e pontos quânticos; uma dimensão, que compreende, por exemplo, os nanobastões e nanotubos; duas dimensões, que caracterizam os nanofilmes; e três dimensões, que incluem os nanomateriais na faixa de 1 e 100 nm (GHALANDARI *et al.,* 2011). As diferentes combinações desses materiais com polímeros, biomoléculas ou outro material nanoestruturado pode gerar partículas de tamanho maior que 100 nm, os chamados nanocompósitos. Estes apresentam boas propriedades físico-químicas como solubilidade, difusividade, cor e resistência (HU; ARYAL; ZHANG, 2010). Por isso, o uso da nanotecnologia nas indústrias expandiu-se rapidamente, inclusive, na indústria de alimentos (CHELLARAMA *et al.,* 2014).

3.4.2. Aplicações na indústria de alimentos

No setor de alimentos, a nanotecnologia tem sido vastamente aplicada em diferentes áreas. Pode ser aplicada em embalagens, aumentando sua resistência térmica, melhorando suas características físicas, químicas e biológicas. Uma das vertentes dessas embalagens é a criação da barreira protetora via nanocompósitos, que mantém atmosfera inerte e com baixo

fluxo de oxigênio, inibindo o crescimento de microrganismos e a deterioração do material, sendo muito aplicada em frutos pós-colheita (CHELLARAMA *et al.*, 2014).

Outra aplicação da nanotecnologia nesta indústria é no aumento do valor nutricional do alimento, como por exemplo, a utilização de nano-gotas de dispersão de vitaminas, que são usadas para melhorar a absorção de nutrientes, além das técnicas de encapsulamento, em que os probióticos necessários e outros produtos são direcionados para o sistema humano com a ajuda de cápsulas nanoestruturadas (MAURIZIO *et al*., 2005). O suplemento alimentar via nanoestruturas se mostra muito eficaz, pois estas reagem facilmente com células humanas devido ao seu tamanho (CHAUDHRY *et al*., 2008).

No processamento de alimentos, que é a conversão do alimento *in natura* em outras formas que aumentem a comercialização e vida útil, a nanotecnologia se aplica, principalmente, no uso de nanoestruturas carreadoras de moléculas funcionais, como a utilização de micelas de caseína para a liberação de compostos hidrofóbicos bioativos; a introdução de técnicas de encapsulamento baseada em gelificação a frio para a liberação de compostos bioativos termosensíveis, incluindo probióticos; introdução de nanocomplexos de β-lg-pectina para entrega de nutracêuticos hidrofóbicos em bebidas ácidas; e o desenvolvimento de nanoestruturas β-lg, nanoencapsulada por pectina, para liberação de bioativos (LIVNEY, 2010).

A inserção dos produtos derivados da nanotecnologia na vida do consumidor tende a aumentar em todo o mundo nos próximos anos (CHEN; WEISS; SHAHIDI, 2006). E acredita-se que a nanotecnologia pode revolucionar o sistema de alimentação e tem o potencial de influenciar a ciência dos alimentos de uma forma positiva, pois pode gerar inovação na textura dos alimentos, processabilidade, gosto, e estabilidade durante a vida de prateleira (SCRINIS; LYONS, 2007). Por isso, se fazem tão importantes as pesquisas nesta área.

3.4.3. Síntese de nanoestruturas de proteína

As nanoestruturas de proteína são de relevado interesse nas pesquisas quando comparadas às outras nanoestruturas. Isso porque são digeridas pelo organismo humano, são biodegradáveis e permitem manipulações em sua estrutura terciária para possibilitar ligação com outras moléculas (WEBER *et al*., 2000).

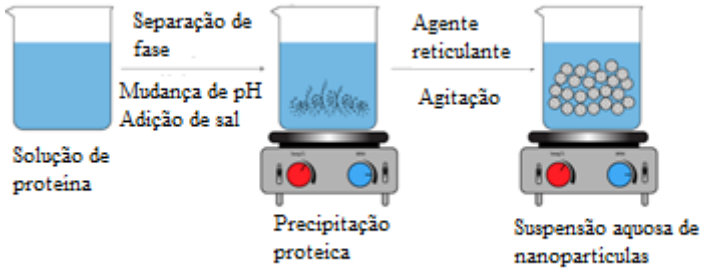
A preparação das nanoestruturas de proteína é influenciada pela composição da proteína, que é dependente de onde a proteína é derivada, por exemplo, se é de origem animal ou vegetal. Qualquer variação nas frações de massa molecular pode gerar alterações significativas na nanoestrutura (PATHAK; THASSU, 2009). A solubilidade da proteína em solventes aquosos ou não aquosos também é um importante parâmetro, pois a estrutura proteica pode se dobrar ou desdobrar dependendo do meio em que se encontra (WANG; ULUDAG, 2008). E assim, os grupos funcionais da proteína, como grupos aminas, carboxilas ou tiol, são ou não expostos por meio dessa modificação conformacional, interferindo na sua capacidade de carregar moléculas bioativas (TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017).

A formação de nanoestruturas de proteína depende diretamente do dessobramento da estrutura proteica, diminuindo as interações intramoleculares hidrofóbicas. Durante o processo de formação de nanoestrutura, a proteína sofre alterações conformacionais que dependem da composição, concentração, pH, força iônica, solvente e método de reticulação (PATHAK; THASSU, 2009).

As nanoestruturas proteicas podem ser obtidas por processos *bottom-up* ou t*op-down*. O *bottom-up* é o processo de obtenção de nanoestruturas a partir das moléculas por meio de processos eletroquímicos, como variação de temperatura, dessolvatação, alteração de pH, como mostrado nos esquemas das Figuras 3 e 4. Já o *top down* é a via de processamento a partir de materiais sólidos, que são supersaturados ou nucleados (SINGH; MANIKANDAN; KUMARAGURU, 2011).

Figura 3. Preparação de nanoestruturas de proteína por dessolvatação, aplicando o álcool etílico (Adaptada de TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017)

Figura 4. Preparação de nanoestruturas de proteína em meio salino com alteração de pH (Adaptada de TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017)



As nanoestruturas de β-lg podem ser formadas por alterações conformacionais devido às condições do pH da solução, à temperatura aplicada, à força iônica, à presença ou não de íons salinos, à concentração da proteína e às moléculas de revestimento. Existem vários protocolos para obtenção dessa nanoestrutura, como o tratamento térmico em um tempo específico em solução ou alteração do pH e mudanças de força iônica sob agitação. Ainda pode ser desenvolvido o processo que envolva ambos os citados (SHAFAEI *et al.*, 2017).

As nanoestruturas de β-lg são formadas pelas forças físicas que agem durante a síntese. Ocorre uma estimulação externa, como alteração de temperatura ou pH, que cria um equílibro de forças repulsivas, como interações eletrostáticas entre grupos de carga similares; e forças atraentes, como Van Der Waals, interações hidrofóbicas e eletrostática entre grupos de carga oposta (YADAV; KUMARI; YADAV, 2011).

No trabalho de Jones e colaboradores (2010), foi estudada a formação da nanoestrutura de β-lg via tratamento térmico dependente do tempo e utilizando pectina metoxila como agente de revestimento. Obtiveram nanoestruturas de 100 a 300 nm entre pH 4 e 7; e os melhores resultados de tamanho, que ficaram entre 100 e 250 nm, e estabilidade foram obtidos no ponto isoelétrico da β-lg (pI 5,2).

Já no trabalho de Ghalandari e colaboradores (2011), foi utilizado o processo de alteração do pH (3, 4,5 e 7) para obtenção da nanoestrutura de β-lg, utilizando a metoxil pectina como agente revestidor e o fosfato de sódio a 10mM como tampão. Conseguiram obter partículas com tamanho inferiores a 200 nm e com boa estabilidade coloidal no pH de 4,5, que é o mais próximo do ponto isoelétrico dessa proteína, sendo, então o perfil de cargas equilibrado neste pH.

No trabalho de Costa (2016), foi feita a investigação da síntese da nanoproteína de β-lg, variando as temperaturas e tempos do processo, mantendo em solução salina de 50 mM de NaCl. Obteve-se o melhor tamanho, 109 nm, e melhor índice de polidispersão na temperatura de 100ºC, mantendo-se por 60 minutos. Logo, a síntese dessa nanoestrutura se revela como simples e, por isso, de alto potencial de aplicabilidade.

3.5. Nutracêuticos

3.5.1. Definição

A denominação de nutracêuticos foi introduzida a cerca de 30 anos atrás por Stephan De Felice. Sabe-se que são originários dos nutrientes e fármacos, sendo superiores aos nutrientes por possuírem funcionalidades medicinais e benéficas para saúde do consumidor (TELESSY, 2019).

Nutracêuticos são considerados suplementos nutricionais, que são capazes de tratar ou prevenir doenças, sendo qualquer substância que possa ser considerada um alimento ou parte de um alimento e que forneça benefícios médicos e de saúde. Os nutracêuticos podem ser nutrientes isolados, suplementos de dieta, produtos fitoterápicos e alimentos processados (DUDEJA; GUPTA, 2017).

Destaca-se que, os nutracêuticos são diferentes de alimentos funcionais, que são alimentos suplementados com o objetivo de suprir as necessidades nutricionais, como quantidade de vitaminas, proteínas ou sais minerais. Enquanto os nutracêuticos são os próprios alimentos funcionais acrescidos de terem funcionalidade de prevenção e/ou tratamento de doenças e/ou outros distúrbios (RAJAT *et al*., 2012).

Os nutracêuticos são classificados com base em sua natureza química e também no tipo de alimento e se são tradicionais ou não, conforme Tabela 3. Assim, podem ser organizados de acordo com: os constituintes químicos, como fenóis, alcaloides, ácidos graxos, minerais; em relação à sua disponibilidade natural no alimento, ditos nutracêuticos tradicionais, e àqueles adicionados aos alimentos no processo de produção industrial ou alimentos resultantes de melhoramento agrícola, ditos não tradicionais (GUPTA *et al*., 2010) e de acordo com o tipo alimentar, como vitaminas e minerais (DUDEJA; GUPTA, 2017).

Tabela 3. Classificação dos Nutracêuticos (Adaptado de DUDEJA; GUPTA, 2017)

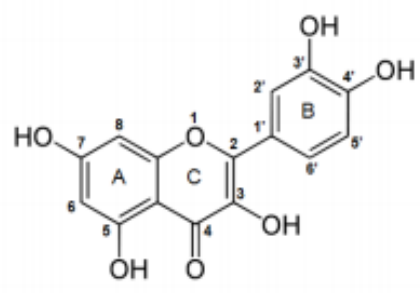
	Categoria	Detalhes	Exemplo
Tipo de Alimento			
A	Nutrientes	Potencializam as funções nutricionais	Vitaminas, minerais, aminoácidos
B	Herbais	São extratos ou concentrados botânicos	Aloe vera, gengibre, alho
C	Suplementos	São adicionados ao alimento para exercer uma função específica	Grão refinados, como a soja
Tradicional/não tradicional			
A	Tradicional	Quando não se altera o alimento	Frutas, vegetais
B	Não tradicional	Quando há adição de ingredientes ao alimento tradicional	Ácido fólico adicionado a farinha de trigo, cálcio adicionado a sucos

Dentre as funcionalidades dos nutracêuticos, destacam-se: os reforços de imunidade, por meio de flavonoides, como a quercetina; auxílio na recuperação de doenças degenerativas, utilizando a vitamina E e creatina; também são úteis no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardíacas e obesidade (DUDEJA; GUPTA, 2017). Dois nutracêuticos de relevada importância são a quercetina e a vitamina B_2.

3.5.2. Quercetina

O nome quercetina deriva de *quercetum* (floresta de carvalhos) e é usado desde 1857. Sua estrutura é mostrada na Figura 5 e consiste em um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirano (D'ANDREA, 2015).

Figura 5. Estrutura química da quercetina (D'ANDREA, 2015)



A quercetina pertence ao grupo dos compostos fenólicos vegetais e foi isolada e reconhecida biologicamente em 1936 por Szent-Gyorgyi (RUSZNYAK; SZENT-GYORGYI, 1936). É um flavonoide com característica antioxidante muito forte. A quercetina é encontrada principalmente em vegetais e frutos e, presente na dieta humana, oferece proteção contra várias doenças como osteoporose, melanomas, doenças pulmonares e cardíacas e atua contra o envelhecimento (PATEL *et al*., 2018).

A estrutura química da quercetina pura é uma aglicona não conjugada e sem fração de carboidrato. Porém, na maioria dos alimentos, a quercetina é encontrada com carboidrato em sua estrutura, sendo denominada quercetina glicosilada. Um dos mais importantes glicosídeos é a rutina. Os tipos de quercetina conjugados com carboidratos levam à melhor absorção pelo organismo humano. Sua absorção também depende da solubilidade do veículo usado na sua administração, uma vez que ela é insolúvel em água (PATEL *et al*., 2018).

Seu potencial antioxidante, principal fator atrativo dessa molécula, é dado pelas propriedades sequestrantes de radicais livres e por sua capacidade de quelar íons metálicos. Portanto, muitos estudos se voltam para sua aplicação no tratamento do câncer, pois pode regular o ciclo celular, conseguindo diminuir a resistência às drogas e induzir a apoptose de células tumorais, logo, é um potente composto antitumoral que pode reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia (BEHLING *et al*., 2004).

Além dos empecilhos químicos que afetam a biodisponibilidade da quercetina, a quercetina está sujeita a problemas do processamento industrial, como alterações de temperatura, luz, oxigênio, umidade e pH, que contribuem para alterações em sua estrutura e,

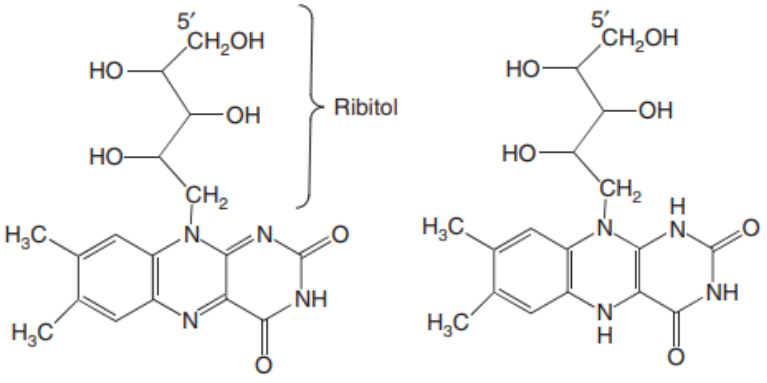
consequentemente, em sua capacidade nutricional (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008).

Assim, a encapsulação de quercetina através das nanoproteínas de β-lg é uma alternativa para aumentar a biodisponibilidade desse nutracêutico, potencializando seus benefícios fisiológicos.

3.5.3. Vitamina B_2

A vitamina B_2, também chamada de riboflavina, é a molécula de 7,8-dimetill-10-(19-D-ribitil)isoaloxazina, é um composto orgânico da classe das flavinas. Pode existir na sua forma oxidada ou reduzida, conforme Figura 6, a partir das quais são formadas duas coenzimas: mononucleótido de flavina (FMN) e dinucleótido de flavina adenina (FAD), fundamentais na precursão de diversas vias metabólicas. A vitamina B_2 pode ser encontrada livre ou ligada à proteína (NOHR; BIESALSKI; BACK, 2002). O organismo humano não a sintetiza, logo, deve ser ingerida nas dietas, sendo o leite a melhor fonte desse bioativo, que é encontrada também em carne, peixe e em vegetais de cor verde-escura (POWERS, 2003).

Figura 6. Estrutura química da vitamina B_2 oxidada e reduzida, respectivamente (NOHR; BIESALSKI; BACK, 2002)



A vitamina B_2 é essencial para saúde humana e animal, pois é um importante protetor de doenças cardiovasculares e processos tumorais, além de ser precursora de diversas atividades metabólicas, como o metabolismo de gorduras e açúcares e reparo do DNA. A deficiência de riboflavina é grave e é correlacionada como um fator de risco para o câncer,

embora pesquisas adicionais sejam necessárias para a confirmação deste fato em humanos (COSTA, 2016)

A riboflavina é uma molécula afipática, o que permite a interação com partes hidrofóbicas e hidrofílicas dos aminoácidos. A cadeia ribitil confere a parte hidrofílica e a isoaloxazina confere a parte hidrofóbica (POWERS, 2003). A nomenclatura final de flavina se refere à coloração amarela. É uma molécula altamente estável a altas temperaturas, porém é fotossensível, sendo fotodegradada para lumiflavina em condições alcalinas ou para lomicrômio em condições ácidas, sendo ambas as espécies inativas biologicamente (NOHR; BIESALSKI; BACK, 2002).

Por esse motivo, o processamento e estocagem de alimentos que contenham a vitamina B_2 devem ser feitos de maneira cautelosa. Portanto, a sua encapsulação utilizando a proteína do soro do leite β-lg nanoestruturada, surge como alternativa viável a este problema.

3.6. Encapsulamento de moléculas bioativas

O encapsulamento de nutracêuticos é uma alternativa amplamente estudada para protegê-los do processamento industrial, armazenamento e interações químicas com outros compostos (AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2007). Além disso, permite que os bioativos sejam liberados controladamente e que tenham um alvo específico (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2012).

A eficiência do processo de encapsulamento depende da técnica aplicada, como por exemplo, a matriz de dispersão e as condições fisiológicas específicas de interesse de liberação do composto (TAVARES *et al*., 2014). Essas técnicas têm que ser específicas para os bioativos de interesse, logo, se deve avaliar a natureza do encapsulado e também do encapsulante (AUGUSTIN; SANGUANSRI, 2007). Outro fator considerável é o alimento em que esse encapsulado será inserido, que deve ser uma matriz que não interfira nas propriedades do bioativo e que o preserve desde o processamento até o consumidor (GIBBS *et al*., 1999).

A nanotecnologia contribui para o avanço do encapsulamento, refinando suas técnicas, por exemplo, através das nanoemulsões, nanolipossomos, nanopartículas e nanotubos. Além disso, buscam-se nanocompósitos que sejam aplicáveis na indústria alimentícia, ou seja, que sejam reconhecidas como GRAS – Geralmente Reconhecidos Como

Seguro – que é uma designação da *Food and Drug Administration* (FDA) para adição de novas substâncias aos alimentos. (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006).

O potencial de encapsulamento de bioativos em nanoestruturas é comprovado, sendo uma área amplamente estudada e uma forte alternativa para otimizar a biodisponibilidade e estabilidade dessas moléculas desde o processamento até o consumo, melhorando também, sua absorção no trato gastrointestinal (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006). Isso ocorre devido ao pequeno tamanho das nanoestruturas e sua grande área superficial (OKAGUA *et al*., 2019).

As proteínas são excelentes candidatas para sistemas de encapsulação e liberação de bioativos. Possuem propriedades físico-químicas e fisiológicas particulares e suas estruturas são capazes de fazer diferentes interações químicas, além disso, são biocompatíveis, biodegradáveis e possuem baixa toxicidade (SHAFAEI *et al*., 2017).

Como exemplo, as caseínas são capazes de se ligarem de forma espontânea a nanoestruturas de cálcio e fosfato de cálcio, por meio de seus resíduos de fosfato de serina. A α-lactoalbumina também se liga facilmente ao cálcio, já a lactoferrina se liga ao íon férrico (FOX; MCSWEENEY, 2003). A β-lg pode se ligar a diversas moléculas como vitamina D (FORREST; YADA; ROUSSEAU, 2005), ômega-3 (ZIMET; LIVNEY, 2009) e retinol (FOX; MCSWEENEY, 2003). Geralmente, a interação das proteínas com os bioativos ocorrem via interação hidrofóbica, ligação de hidrogênio ou atração de Vander Waals (OKAGUA *et al*., 2019).

A capacidade da β-lg de interagir com vários ligantes é resultante de sua estrutura. O principal sítio de ligação hidrofóbica é a cavidade interna, denominada cálice. No entanto, os segundos sítios de ligação são os resíduos de aminoácidos Trp19, Tyr20, Tyr42, Gln44, Gln59, Gln68, Leu156, Glu157, Glu158 e His161. Tyr102, Leu104 e Asp129 são os terceiros sítios, por isso, é uma molécula tão versátil (SHAFAEI *et al*., 2017).

No estudo de Liang e colaboradores (2008) foi investigada a interação do resveratrol, um importante regulador do colesterol, com a β-lg e foi observado um bom potencial da aplicação dessa proteína no encapsulamento e transporte desse bioativo. Já no estudo de Ghalandari e colaboradores (2011) alcançou-se a encapsulação da oxaliplatina, droga aplicada no tratamento do câncer, na β-lg, via interação hidrofóbica no cálice da proteína. Já Zhang e colaboradores (2014) fizeram o estudo da possibilidade de ligar diferentes moléculas bioativas

na estrutura da β-lg e concluíram que foi possível encapsular de dois a três compostos simultaneamente nessa proteína, o que comprova a versatilidade dessa matriz.

Diarrassouba e colaboradores (2015) investigaram a interação entre a vitamina D_3 e as nanoestruturas de β-lg. Foi feita a simulação do fluido intestinal e estomacal via solução química. Neste estudo, conseguiram realizar a encapsulação e o complexo se manteve estável em pH ácido, que é o do estômago, e somente foi degradado em pH básico, como é o do intestino. Logo, a nanoestrutura de β-lg foi eficiente na proteção da vitamina D_3 contra a rápida digestão, aumentando sua biodisponibilidade.

No trabalho de Costa (2016), foi feita a encapsulação da quercetina na nanoestrutura de β-lg via nanossistemas de nanoestruturas poliméricas. Foram avaliados os parâmetros de eficiência de encapsulação e capacidade de ligação, conseguindo atingir 85,16% de eficiência, comprovando que a nanoestrutura de β-lg é capaz de encapsular esse importante bioativo. E com isso, comprova-se a necessidade de pesquisas que utilizem essa nanoestrutura para carregamento de bioativos, haja vista sua comprovada eficiência e variabilidade de ligações com diferentes nutracêuticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A β-lactoglobulina (β-lg) foi gentilmente cedida pela Davisco Foods International (EUA). O leite pasteurizado comercial tipo C e coalho (enzima quimosina) da marca HA-LA foram usados no preparo do queijo minas frescal. A água destilada empregada nos experimentos foi purificada via osmose reversa Hidrotek (Portugal). Reagentes químicos de graus analíticos sem purificações adicionais foram utilizados.

4.2. Obtenção e caracterização do tamanho da nanoestrutura de β-lg

As nanoestruturas de β-lg já foram obtidas e caracterizadas pelo grupo de pesquisa Nanotec (UFSJ) em trabalhos anteriores de Costa (2016). A nanoestrutura foi obtida ao solubilizar 2 $mg \cdot mL^{-1}$ de β-lg em uma solução de 50 $mmol \cdot L^{-1}$ de NaCl e, posteriormente, foi aquecida em banho ultratermostático à 100°C por 60 min.

O tamanho da estrutura foi determinado via Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) no equipamento Zeta Sizer S (Malvern Instrument, Inglaterra) a 25,0 ± 0,5 ºC em triplicata sem qualquer purificação adicional, sendo definidos o raio hidrodinâmico (RH) e o índice de polidispersividade (PDI). A medição dos valores de PDI oferece informações a respeito da distribuição de tamanho de estruturas dentro da amostra, variando de 0 a 1, sendo assim, quanto menor este índice, mais monodispersa e homogênea são os tamanhos das estruturas na amostra (MALVERN, 2009). O equipamento utiliza um detector de fotodiodo de avalanche (Brookhaven BI-APD, USA) e um correlacionador (TURBOCORR, Brookhaven, USA). A fonte de luz (CVI Melles Griot, USA) foi um laser HeNe de 35 mW de potência e λ = 632,80 nm, linearmente polarizada. Para controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. O ângulo de detecção foi fixo em 173º.

4.2.1. Análise do tamanho e morfologia via Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão, MET, foram obtidas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). O microscópio utilizado foi o TEM JEOL-1400 PLUS (120

kV), com filamento de Hexaboreto de Lantânio (LaB_6), equipado com câmera Gatan OneView com 4K x 4K pixel. Antes da fixação da amostra nas grids de cobre, essas grids foram descarregadas eletricamente pelo sistema de descarga Pelco easiGlow-Ted Pella (EUA) a 15 mE por 10 s com o objetivo de melhorar a molhabilidade delas. Posteriormente, uma gota da suspensão produzida de nanoestrutura de proteína a 2 $mg \cdot mL^{-1}$ foi adicionada à grid de cobre de 200 mesh com filme ultrafino de carbono. Após 30 s, o excesso da amostra foi retirado com papel de filtro, e, em seguida, uma gota de solução aquosa de contrastante acetato de uranila a 2% (m/v) foi adicionada sobre a grid. Após 30 s, o excesso foi novamente retirado com papel de filtro. Este processo foi repetido 3 vezes. Ao final dele, uma gota de água deionizada foi adicionada à grade por 5 s para eliminar o excesso de sal utilizado na obtenção de nanoestrutura. Em seguida, a grade permaneceu à 25 ºC até secagem e armazenada para posterior análise.

As análises de crioscopia (Cryo-TEM) foram conduzidas no mesmo microscópio eletrônico utilizado para análises de MET. Para essa análise as grids de 200 mesh para crioscopia passou pelo mesmo procedimento supracitado de descarga elétrica. Após esse processo, a grid foi resfriada com etano líquido sob ambiente de nitrogênio líquido e transferida automaticamente (2-3 s) para o sistema de vitrificação automatizada Vitrobot (Mark IV, Thermo Fischer Scientific, EUA). A amostra foi adicionada na grid no Vitrobot e o excesso da amostra ocorreu por força de transferência negativa (força de blot = -3) e tempo de blotting de 3s.

As medições de tamanho via imagens da MET foram realizadas com auxílio do software ImageJ. As medições foram realizadas em dois grupos distintos de estruturas isoladas e lineares, sendo realizadas vinte medições de comprimento e vinte de diâmetro em quatro estruturas diferentes, pertencentes a estes dois grupos.

4.2.2. Estabilidade no tempo de armazenamento a 4ºC

A nanoestrutura foi armazenada a 4 ºC para avaliar sua estabilidade ao longo do tempo, sendo determinado o tamanho da estrutura, PDI e potencial Zeta nos dias 0, 5,10, 15, 30 e 60 após a otenção. Esta temperatura foi investigada por ser a temperatura de armazenamento dos queijos produzidos e por não necessitar da adição de conservantes, como seria o caso ao se trabalhar a temperatura ambiente (25ºC).

O tamanho e o PDI da nanoestrutura seguiram a metodologia descrita no item 4.2. O potencial Zeta também foi avaliado por ele expressar a carga interfacial da nanoestrutura, um fator importante para determinar a dimensão das interações coloidais e a estabilidade coloidal das nanoestruturas. O potencial zeta foi determinado por eletroforese a laser Doppler. As medições foram realizadas em triplicata no equipamento Zeta Sizer S (Malvern Instrument, Inglaterra) a 25,0 ± 0,5 ºC.

4.2.3. Propriedade espumante da nanoestrutura de β-lg

Amostras de 8,0 mL da nanoestrutura, em triplicata, foram homogeneizadas em um Ultra Turrax (Biovera, Brasil) por 1 min em 14.000 rpm. Após a agitação, acompanhou-se a altura da espuma medindo-a em intervalos de tempo a fim de calcular as variáveis: incremento de volume (VI, Equação 1) e estabilidade da espuma (FS, Equação 2).

$$VI = \left[\frac{\frac{V_T}{V_E} - V_T}{V_T}\right] X100 \quad \textbf{(1)}$$

$$FS = \left[\frac{V_{Et}}{V_{Et0}}\right] \quad \textbf{(2)}$$

Sendo V_T o volume total da solução, V_E o volume da espuma, V_{Et} e V_{Et0} os volumes da espuma correspondentes aos instantes t (30, 60 e 120 min após a homogeneização) e no tempo zero, respectivamente. Amostras de proteína sem tratamento térmico foram utilizadas como controle, segundo Santos e colaboradores (2019).

4.2.4. Propriedade emulsificante da nanoestrutura de β-lg

O Índice de Atividade Emulsificante (IAE) da proteína nativa e da proteína nanoestruturada foram determinados de acordo Cameron e colaboradores (1991). Amostras de proteína (150,0 µL) a 0,1% ($m \cdot v^{-1}$) com óleo de girassol (2,5 mL) e água destilada (7,35 mL) foram homogeneizadas em Ultra Turrax por 1 min a 14.000 rpm. Após a agitação, 10,0 µL de amostras de cada emulsão foram retiradas em diferentes tempos (0, 5, 15 e 30 min) e diluídos em 10,0 mL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% ($m \cdot v^{-1}$). A absorbância foi medida a 500,0 nm em espectrofotômetro UV-Vis Global Trade Technology (São Paulo, Brasil). O IAE foi calculado de acordo com a Equação 3 e a estabilidade da emulsão (ESI)

com a Equação 4.

$$IAE\ (m^2 . g^{-1}) = \left[\frac{2x2{,}303xA_0xFD}{cx(1-\theta)\text{x}1000}\right] \quad \textbf{(3)}$$

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_t} x\ t \quad \textbf{(4)}$$

Sendo A_0 a absorbância no tempo igual a zero, FD o fator de diluição, c a concentração inicial da proteína ($g.mL^{-1}$); θ a fração de óleo (0,25) e A_t as absorbâncias das emulsões diluídas em 30, 60 e 120 min.

4.3. Encapsulamento de quercetina e vitamina B_2 na nanoestrutura de β-lg

Foram adicionadas diferentes concentrações de quercetina e vitamina B_2 em microtubos previamente pesados em balança analítica de seis casas decimais, juntamente com a nanoestrutura de proteína, como demonstrado nas Tabelas 4 e 5, para atingir a concentração final desejada do bioativo na solução, sendo os ensaios realizados em triplicata. As encapsulações de quercetina e vitamina B_2 foram realizadas separadamente. As amostras foram agitadas manualmente por 5 min e, em seguida, centrifugadas a 13.500 rpm a 20 ºC por 30 min. O sobrenadante foi recolhido e diluído para leitura no espectrofotômetro UV-Vis a 373,0 nm (quercetina) e 445,0 nm (vitamina B_2) para obtenção da eficiência da encapsulação EE (%) pela Equação 5. Em seguida, o *pellet* foi seco em estufa a 50 °C por 48 h e pesado. Pela subtração da massa de cada microtubo obteve-se o valor de W_{np}. Então, o valor da capacidade de ligação (LC) dos bioativos na nanoestrutura foi calculado pela Equação 6 conforme Natarajan e colaboradores (2011) e Li e colaboradores (2009).

$$EE(\%) = (W_{total} - W_{livre}).100/W_{total} \quad \textbf{(5)}$$

$$LC(\%) = (W_{total} - W_{livre}).100/W_{np} \quad \textbf{(6)}$$

Onde, W_{total} é o total de bioativo adicionado; W_{livre} é o total de bioativo livre detectado no sobrenadante; W_{np} é o total de bioativo ligado à nanoestrutura detectado no *pellet*; EE é a Eficiência de Encapsulamento; LC é a Capacidade de Ligação.

Tabela 4. Preparação de diferentes concentrações de quercetina [Q]* em nanoproteína de β-lg para determinar a eficiência de encapsulação

Ensaio	Solução Estoque de Q (1,0 mg.mL^{-1}) em μL	Dispersão de nano β-lg em μL	Água em μL	[Q]* na dispersão de β-lg (μg·mL^{-1})
1	37,50	1000	462,5	25,00
2	75,00	1000	425,0	50,00
3	150,0	1000	350,0	100,0
4	225,0	1000	275,0	150,0
5	450,0	1000	50,00	300,0

Tabela 5. Preparação de diferentes concentrações de vitamina B_2 [V]* em nanoproteína de β-lg para determinar a eficiência de encapsulação

Ensaio	Solução Estoque de V(0,3 mg.mL^{-1}) em μL	Dispersão de nano β-lg em μL	Água em μL	[V]* na dispersão de nano β-lg (μg·mL^{-1})
1	75,00	1000	425,0	0,015
2	150,0	1000	350,0	0,030
3	300,0	1000	200,0	0,060
4	375,0	1000	125,0	0,075
5	450,0	1000	50,00	0,090

O ensaio de quercetina e de vitamina B_2 com maior eficiência de encapsulamento foi analisado quanto ao tamanho da partícula, índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta.

4.4. Produção do queijo minas frescal incorporado com nanoestrutura de β-lg

A otimização da produção dos queijos foi feita via planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR), fracionado 2^3, sendo 8 experimentos em 2 níveis, totalizando 17 ensaios, com 6 experimentos nos pontos axiais e 3 repeticões no ponto central. As variáveis independentes foram as concentrações de nanoestruturas de β-lg, NaCl e KCl, conforme a Tabela 6. A matriz com os limites e níveis de cada uma destas variáveis estão na Tabela 7. As variáveis resposta foram pH, sólidos solúveis totais (ºBrix), condutividade (mS·cm^{-1}), acidez titulável (% Ácido Lático), firmeza superior (N), firmeza lateral (N), coesividade, adesividade (g.s), elasticidade, dureza (N) e mastigabilidade (N). Os dados foram tratados no Software Statistica 7.

Tabela 6. Planejamento experimental de delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3, sendo 8 experimentos em 2 níveis, totalizando 17 ensaios, com 6 experimentos nos pontos axiais e 3 repeticões no ponto central tendo como variáveis independentes as concentrações de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e da nanoproteína β-lg

Ensaios	**Variáveis codificadas**			**Variáveis descodificadas**		
	NaCl (g·L^{-1})	*KCl(g·L^{-1})*	*Nano β-lg (mg·Kg^{-1})*	*NaCl (g·L^{-1})*	*KCl(g·L^{-1})*	*Nano β-lg (mg·Kg^{-1})*
1	-1	-1	-1	5	20	5
2	-1	1	1	5	5	10
3	1	-1	1	20	20	10
4	1	1	-1	20	5	5
5	0	0	0	12,5	12,5	7,5
6	-1	-1	1	5	20	10
7	-1	1	-1	5	5	5
8	1	-1	-1	20	20	5
9	1	1	1	20	5	10
10	0	0	0	12,5	12,5	7,5
11	-1,67332	0	0	0	12,5	7,5
12	1,67332	0	0	25	12,5	7,5
13	0	-1,67332	0	12,5	25	7,5
14	0	1,67332	0	12,5	0	7,5
15	0	0	-1,67332	12,5	12,5	3,32
16	0	0	1,67332	12,5	12,5	11,68
17	0	0	0	12,5	12,5	7,5

Tabela 7. Matriz dos limites das variáveis: NaCl (g.L^{-1}), KCl (g.L^{-1}) e nanoestrutura de β-lg (mg.kg^{-1})

Variáveis	**-1,67**	**-1**	**0**	**1**	**1,67**
NaCl (g·L^{-1})	0,00	5,00	12,50	20,00	25,00
KCl (g·L^{-1})	25,00	20,00	12,50	5,00	0,00
Nano β-lg (mg·kg^{-1})	3,32	5,00	7,50	10,00	11,68

Os queijos controle, ou seja, sem nanoestrutura foram produzidos conforme Tabela 8, mantendo as concentrações de KCl e NaCl do planejamento experimental.

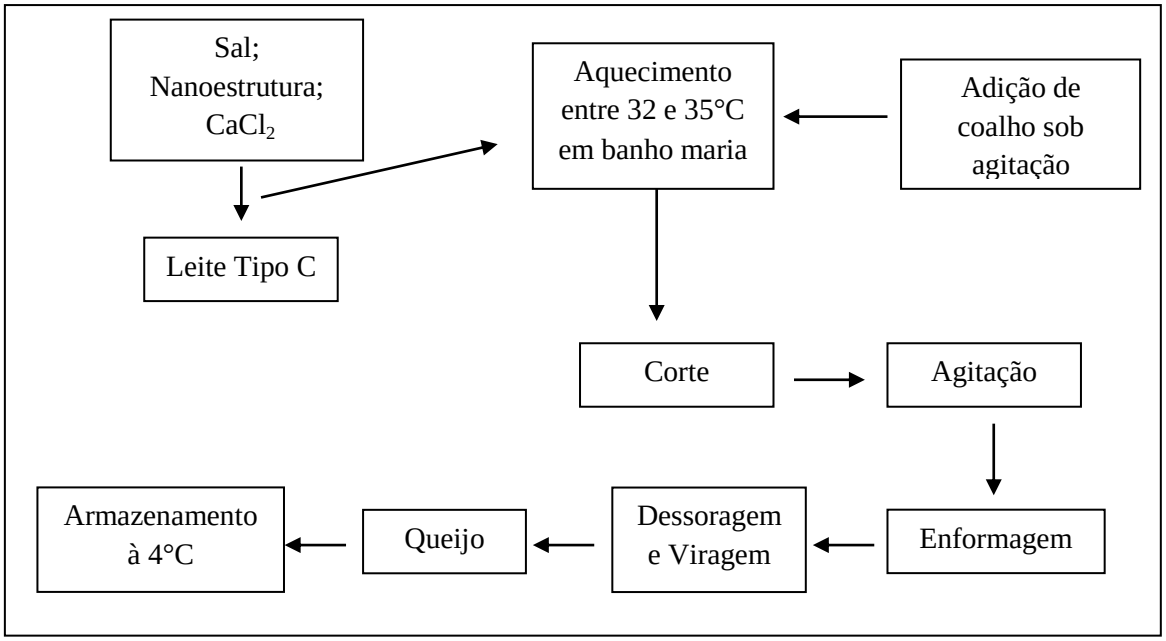
Tabela 8. Preparação de diferentes queijos controle (sem nanoestrutura)

Ensaios	Concentrações salinas	
	NaCl ($g \cdot L^{-1}$)	*KCl*($g \cdot L^{-1}$)
C1	5,0	20,0
C2	5,0	5,0
C3	20,0	20,0
C4	20,0	5,0
C5	12,5	12,5
C6	0,0	12,5
C7	25,0	12,5
C8	12,5	25,0
C9	12,50	0,0

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal, atualizado pela Normativa nº 4/2004, o queijo tipo minas frescal é caracterizado pela coagulação enzimática do leite complementada ou não com a ação de bactérias láticas (BRASIL, 2004). O processo de produção seguiu a metodologia descrita no documento intitulado Queijo Minas Frescal, disponibilizado pela Embrapa (SILVA, 2005) com adaptações. Não foram adicionados fermento e ácido lático, de acordo com os trabalhos de Pieretti e colaboradores (2019) e Santos e colaboradores (2015). Isto foi feito com o objetivo de analisar a interferência da adição de nanoestrutura com e sem bioativos e de KCl ao processo produtivo do queijo minas frescal.

A adição de sal, de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e da nanoestrutura foi no leite pasteurizado tipo C, antes da etapa de aquecimento, conforme Figura 7. Cada queijo foi produzido com 500,0 mL de leite. As massas adicionadas de sal (cloreto de sódio e cloreto de potássio) e nanoestrutura foram calculadas conforme o DCCR; coalho foi adicionado conforme indicações do fabricante Ha-La e o cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 0,02% ($m.v^{-1}$) em relação ao volume de leite. Os queijos foram enformados em potes plásticos de 100,0 mL com furos no fundo para escoamento do soro e apresentaram, em média, 5,8 cm de diâmetro, 2,5 cm de altura e 50,0 gramas de massa.

Figura 7. Fluxograma da produção do Queijo Minas Frescal com e sem nanoestrutura de β-lg



4.5. Análises Físico-químicas do Queijo com e sem nanoestrutura de β-lg

Para as análises físico-químicas, os ensaios foram realizados em triplicata e seguiu-se a metodologia preconizada pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.5.1. pH e Sólidos Solúveis Totais

Os queijos foram submetidos às análises de determinação do pH e análise de sólidos solúveis totais (SST) utilizando pHmetro Digimed (Brasil) e refratômetro Instruterm (Brasil), respectivamente. Para isso, 5,0000 g de queijo foram adicionados em 50,0 mL de água destilada, triturados para homogeneização e posterior análise.

4.5.2. Condutividade

A condutividade (mS/cm) foi avaliada em condutivímetro (Tecnopon MCA 150). Para isso, 5,0000 g de queijo foram adicionados em 50,0 mL de água destilada, triturados para homogeneização e posterior análise.

4.5.3. Acidez Titulável

A acidez foi determinada para identificação do teor de ácido lático, e calculada pela Equação 7.

$$\% \text{ Acidez Titulável} = \frac{V*f*0,9}{m} \quad \textbf{(7)}$$

Onde, V é o volume de NaOH gasto na titulação; f, o fator da solução de NaOH, 0,9 é o fator do ácido lático e m, a massa de queijo.

4.6. Análise do Perfil de Textura dos Queijos

4.6.1. Análise de Firmeza

A análise instrumental da firmeza foi realizada seguindo Piazzon-Gomes e colaboradores (2010). As amostras de queijo continham aproximadamente 5,8 cm de diâmetro e altura média de 2,5 cm. A firmeza foi aferida no 4º dia após a fabricação dos queijos com o auxílio de um penetrômetro digital (Penetrômetro digital DD-2000, Instrutherm), realizando-se 3 leituras equidistantes lateralmente (horizontal) e outras 3 na parte superior (vertical) das diferentes formulações de queijo. Os resultados foram expressos em Newton (N).

4.6.2. Análise Instrumental do Perfil de Textura (TPA)

A análise instrumental do perfil de textura experimental (TPA) foi realizada seguindo Piazzon-Gomes e colaboradores (2010). As amostras de queijo continham aproximadamente 5,8 cm de diâmetro e altura média de 2,5 cm para todas as análises.

Os parâmetros de dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e mastigabilidade, foram determinados no 3º dia após a fabricação dos queijos, empregando-se o teste de dupla compressão até 50% da altura inicial da amostra, a uma velocidade de 2,0 $mm \cdot s^{-1}$, à 25 ºC, com tempo de 5 s entre as compressões, utilizando Texturômetro TA.TX Plus Texture Analyser da Stable Micro Systems, contendo uma probe cilíndrica de 10,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura. Os resultados de dureza e mastigabilidade são expressos em Newton (N), adesividade em Joule (g.s), coesividade e elasticidade são adimensionais.

4.7. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o Software Statistica 7. A análise de variância (ANOVA), com índice de confiança de 95%, foi realizada para determinar como as variáveis independentes do DCCR, afetaram os valores das variáveis de resposta. Para análise estatística da estabilidade, emulsão, espuma, encapsulamento e

comparações dos queijos do planejamento com os queijos controle, foi realizado o teste Tukey ao nível de 5% de significância, sendo uma metodologia de comparação pareada dos resultados obtidos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção e caracterização da nanoestrutura de β-lg

A nanoestrutura de β-lg obtida apresentou tamanho médio de 109,95 ± 0,68 nm e PDI de 0,4062 ± 0,0539. O tamanho está dentro do estabelecido em Uskoković (2007), o qual afirma que nanoestruturas são materiais cujo tamanho varia de 10 a 300 nm. Apesar do tamanho encontrar-se na faixa considerada nanoestrutura, sabe-se que o mais importante é essa estrutura apresentar novas ou aprimoradas propriedades em relação ao material não nanoestruturado. O PDI ficou próximo do considerado ideal pela literatura (PDI < 0,4), indicando que a nanoestrutura obteve boa polidispersividade, pois, quanto menor este valor, mais monodispersa é a nanoestrutura (MADALENA, 2016).

Resultados similares foram encontrados por Madalena e colaboradores (2016), no qual as nanoestruturas de β-lg obtidas apresentaram tamanho de 168,0 ± 3,0 nm, utilizando a metodologia de aquecimento, porém a 80 ºC por 10 min e ajustando o pH da solução para 6,0 antes de aquecer. Já Simões e colaboradores (2020) sintetizaram a nanoestrutura de β-lg com 88,6 ± 4,2 nm, sendo necessário manter a solução de β-lg em tampão fosfato com pH 6,0 a 4 ºC *overnight* e, em seguida, filtrar em membrana de 0,2 µm de acetato de celulose antes de realizar o aquecimento a 80 ºC por 15 min, seguido de banho de gelo por 10 min. Então, as diferenças encontradas nas sínteses da nanoestrutura de β-lg, como pH, temperatura, solução salina, tempo de aquecimento, refletem no tamanho obtido, sendo que a síntese da nanoestrutura deste trabalho é uma alternativa altamente viável, visto que é um método mais simples e rápido, utilizando poucos reagentes e sem a necessidade de um agente de revestimento.

5.1.1. Análise de tamanho e morfologia via Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de MET das nanoestruturas de β-lg estão representadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 8. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoestruturas de β-lg com escala de 200 nm utilizando o método de *negative stain* para o preparo da amostra (A) e (B)

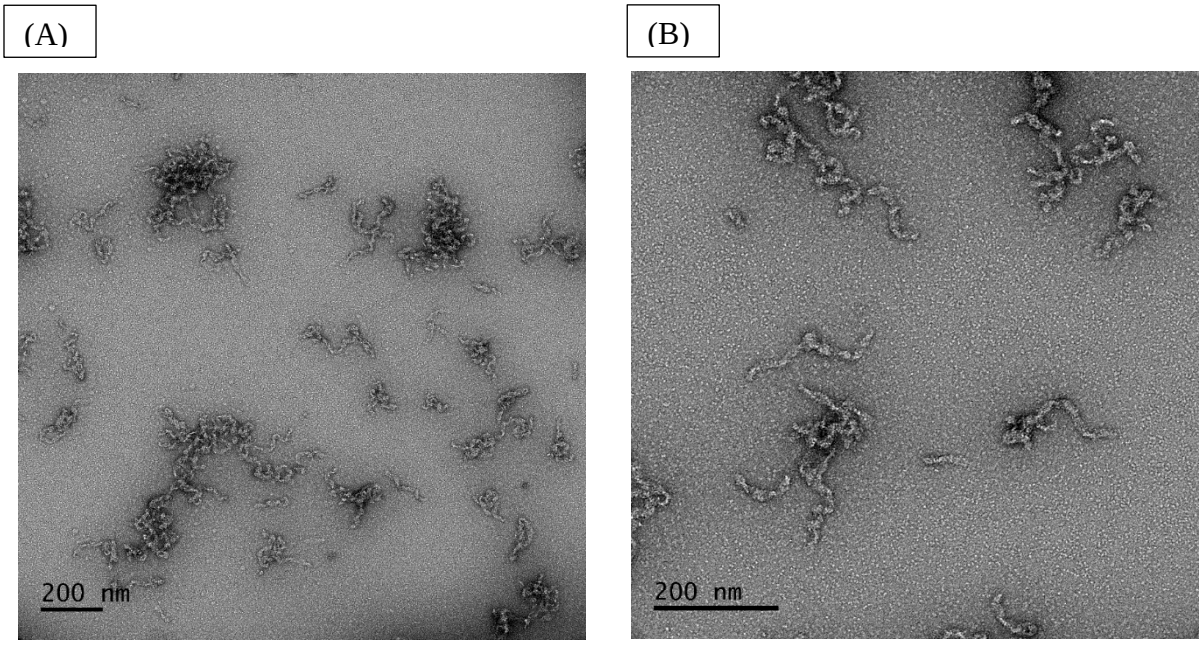
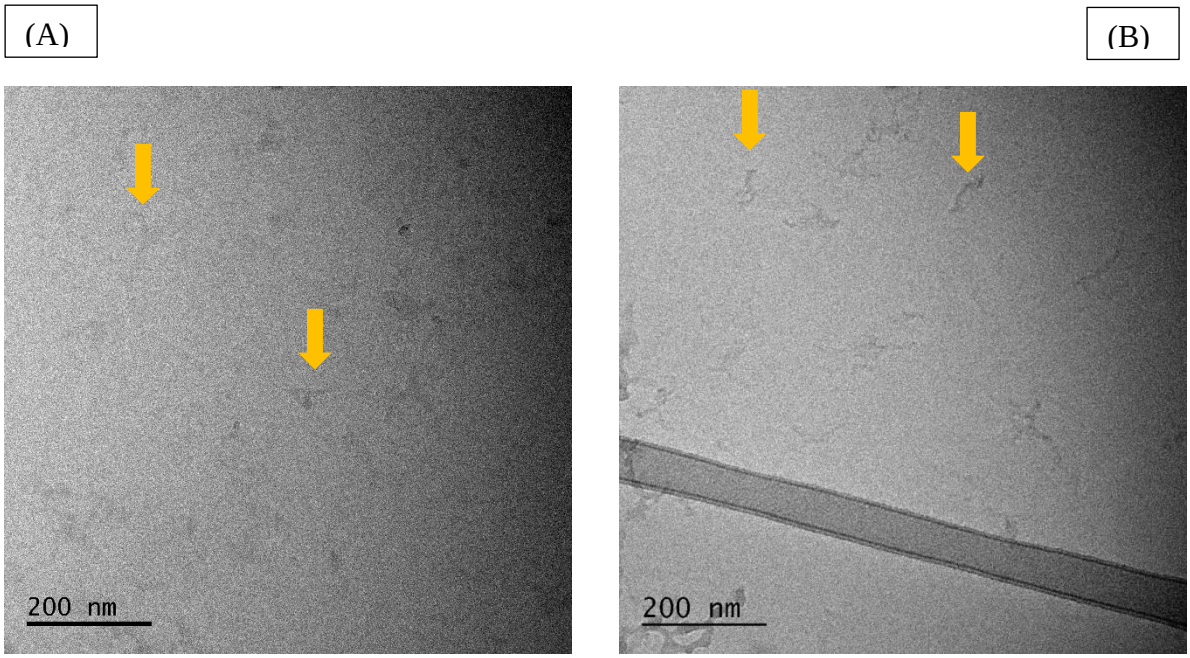


Figura 9. Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanoestruturas de β-lg com escala de 200 nm utilizando crioscopia para o preparo das amostra (A) e (B)



As imagens confirmam o tamanho nanométrico da proteína obtido via DLS. Nota-se que, a estrutura é mantida, mesmo utilizando diferentes técnicas de preparo de amostras, *negative stain* e crioscopia. A nanoestrutura apresenta um formato de fibrila, que por ser

proteica, possui ramificações e estrutura mais complexa. Nota-se também a dispersão com nanoestruturas isoladas e a tendência de alguns grupos se aglomerarem, o que lhes garante maior estbilidade coloidal, corroborado pelo resultado de potencial zeta no item 5.1.2.

As análises morfométrica por meio do software ImageJ apresentaram tamanho médio do comprimento da fibrila para as estruturas dispersas de 178,52 ± 16,14 nm e 18,98 ± 6,32 nm de diâmetro. Os tamanhos das nanoestruturas obtidos pelas imagens de microscopia foram maiores que os obtidos pelo DLS. O DLS mede o tamanho hidrodinâmico da estrutura e a microscopia mede o tamanho da estrutura seca; portanto, era esperado que o tamanho medido pelo DLS fosse maior que o da microscopia (SOUZA; CIMINELLI; MOHALLEM, 2016).

Proteínas em soluções aquosas, como utilizadas na análise DLS, tendem a se agregar rapidamente, devido às interações intra e intermoleculares, principalmente, quando submetidas a baixas temperaturas, como armazenamento a 4 ºC (KOLAKOWSKI; DUMAY; CHEFTEL, 2001). Essas interações ocorrem pelas ligações dos grupos sulfídricos, interagindo com as ligações dissulfeto, determinando a agregação proteica (MADALENA *et al*., 2016; PEREIRA *et al.*, 2010). Isto ocorre para diminuir a energia livre de Gibbs e, assim, diminuir as interações entre a região hidrofóbica da proteína e a solução salina, aumentando a estabilidade coloidal. O que não ocorre quando a amostra está seca, como na MET, o que favorece a linearização das nanoestruturas, justificando o tamanho um pouco maior da nanoestrutura quando analisada por este método. Somado a isso, existe um tempo de secagem da amostra para a realização da análise por MET e esse processo pode ter alterado o tamanho da nanoestrutura. A desidratação da estrutura durante a secagem pode causar o colapso da estrutura por forças capilares (BAILEY; MECARTNEY, 1992) e/ou o alto vácuo da MET (TOBLER; SHAW; BENNING, 2009) pode levar ao relaxamento da estrutura, aumentando seu tamanho.

Na literatura são relatadas nanoestruturas de β-lg com forma semi-esférica (CHAVOSHPOUR-NATANZIA; SAHIHIB, 2019) e esférica (MADALENA *et al*., 2016; SIMÕES *et al*., 2019). Na forma semi-esférica, os autores aplicaram o método de desolvatação com etanol e utilização do gluteraldeído como agente de revestimento. Já nas formas esféricas, os autores também aplicaram o método de aquecimento, porém, com diferentes tempos, temperaturas e soluções salinas, conforme descrito no item 5.1. Esta diferença relacionada ao método de produção resulta em nanoestruturas com diferentes tamanhos e morfologias (TARHINI; GREIGE-GERGES; ELAISSARI, 2017). Ressalta-se

que a metodologia de obtenção da nanoestrutura deste trabalho e a sua morfologia ainda não foram relatadas na literatura.

5.1.2. Estabilidade no tempo de armazenamento a 4ºC

O tamanho das nanoestruturas e o potencial zeta se mantêm aproximadamente constante durante o armazenamento a 4 ºC por 60 dias (Tabela 9).

Tabela 9. Teste de estabilidade sob armazenamento a 4ºC da nanoestrutura de β-lg, sendo medidos Potencial Zeta (mV), Tamanho (nm) e PDI, nos dias 0, 5, 10, 15, 30 e 60 após a síntese

Dia	Zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI
0	-19,30 ± 1,06[a]	138,30 ± 0,55[a]	0,400 ± 0,01[a,b]
5	-19,20 ± 1,05[a]	167,20 ± 4,50[b]	0,456 ± 0,08[c]
10	-17,80 ± 0,94[b,c]	171,80 ± 6,30[b]	0,461 ± 0,02[b,c]
15	-18,50 ± 0,97[a,c]	133,40 ± 0,40[a]	0,359 ± 0,00[a]
30	-16,80 ± 1,21[b]	151,80 ± 2,12[a]	0,345 ± 0,00[a]
60	-17,00 ± 1,16[b]	140,80 ± 0,49[c]	0,426 ± 0,00[a,b]

[a-b-c] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, realizado para cada coluna/variável.

Não há diferenças estatísticas significativas entre os dias de análise para o potencial Zeta pelo teste Tukey. O potencial Zeta é negativo, indicando que a superfície da nanoestrutura de β-lg apresenta carga total negativa, o que corrobora com Mirpoor e colaboradores (2017). Além disso, o pH da nanoestrutura sintetizada é de 7,10 ± 0,01, sendo mais elevado que o ponto isoelétrico da proteína (pI = 5,20), assim, menor quantidade de íons H^+ em solução, prevalecendo a forma negativamente carregada da proteína.

O tamanho se manteve entre 138,3 a 171,8 nm, apresentando diferenças estatísticas entre os dias de análise. Os dias 0, 15 e 30 se assemelham estatisticamente, assim como, os dias 5 e 10. A pequena diferença de tamanho entre os dias pode ocorrer pela polidispersividade da amostra que ficou, em média, em 0,4078 ± 0,0487, não havendo diferenças estatísticas entre os dias de leitura. Este valor é considerado eficiente pela literatura (PDI < 0,4) (MADALENA *et al.*, 2016). Dessa forma, de uma forma geral, pode-se considerar que a proteína não sofreu alterações significativas durante o armazenamento, permanecendo no tamanho nanométrico, sendo um ponto altamente positivo para posterior aplicações em diversos produtos e processos.

A estabilidade das suspensões coloidais de nanoestruturas depende das cargas superficiais das partículas presentes, que, quando se atraem, podem levar a agregação e perda de estabilidade. O sistema é mais estável quando forças repulsivas são mais fortes (CHAVOSHPOUR-NATANZIA; SAHIHIB, 2019).

Este sistema é considerado semi-estável visto que o valor do potencial Zeta se manteve, em média, em -18,1 ± 1,0770 mV e, para ser considerado um sistema totalmente estável, são considerados valores acima de +30 mV e abaixo de -30 mV (DIARRASSOUBA, 2013). Isso ocorre, pois a estabilidade coloidal pode ser comprometida pela interação entre as cargas opostas das partículas. Neste caso, o processo de aquecimento aplicado durante a obtenção da nanoestrutura pode permitir a dissolução de alguns agregados proteicos, promovendo rearranjos estruturais por quebra das ligações dissulfeto, o que resulta em desdobramento e exposição dos grupos sulfidricos, os quais podem formar ligações inter e intra-moleculares, ocasionando a agregação de proteínas e decaímento da estabilidade (MADALENA *et al*., 2016), o que foi confirmado pelas imagens de MET (item 5.1.1), nas quais são possíveis visualizar nanoestruturas isoladas e também em agrupamentos.

5.1.3. Propriedade espumante da nanoestrutura de β-lg

A Tabela 10 apresenta os valores de incremento de volume e estabilidade de espuma para proteína nativa e para nanoestrutura. Nota-se que houve diferença estatística significativa entre a proteína nativa e a proteína nanoestruturada, destacando a diferença de ambas nessa propriedade técnico-funcional. A nanoestrutura foi capaz de gerar maior incremento de volume e obteve melhor estabilidade da espuma do que a proteína nativa.

Tabela 10. Valores de incremento de volume (VI) e estabilidade de espuma (FS) para a proteína nativa e para nanoestrutura de β-lg nos tempos 30, 60 e 120 min

	Proteína Nativa	**Nanoestrutura**
VI	$19,56 \pm 2,34^{a}$	$33,33 \pm 1,59^{b}$
F_{S30}	$36,51 \pm 5,49^{a}$	$64,54 \pm 5,06^{b}$
F_{S60}	$20,63 \pm 6,87^{a}$	$51,52 \pm 2,62^{b}$
F_{S120}	$9,05 \pm 1,65^{a}$	$35,45 \pm 5,06^{b}$

[a-b] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Foi observado que, após 120 min, a proteína nativa não tinha quase nenhuma espuma, enquanto a nanoestrutura apresentava 35,45, resultado semelhante ao de Costa (2016).

Sugere-se que a nanoestruturação da proteína ocasiona aumento da estabilização térmica e da atividade interfacial, devido à mudança conformacional proteica ocasionada pela ligação entre as moléculas. Este resultado é corroborado por Leman e Doga (2003), em que o tratamento térmico de β-lg aumentou a estabilidade da espuma em três vezes quando comparada com a proteína nativa.

Além disso, o aquecimento moderado em tempos determinados na formação da nanoestrutura causa desdobramento parcial da estrutura da proteína, aumenta a flexibilidade e a solubilidade da cadeia proteica, consequentemente, melhora suas interações e extensões na interface líquido-ar (MISHRA; MANN; JOSHI, 2001), aumentando a capacidade de formação de espuma e estabilidade da mesma (WOOSTER; AUGUSTIN, 2007).

A melhoria na capacidade de formação de espuma pela nanoestrutura de β-lg representa uma alternativa viável para a substituição de outros ingredientes na indústria de alimentos, como o NaCl ou proteínas do ovo, conferindo melhorias nos aspectos de textura dos produtos, podendo ser especialmente aplicada em laticíneos na produção de queijos e iogurtes.

5.1.4. Propriedade emulsificante da nanoestrutura de β-lg

A Tabela 11 mostra que o índice de emulsão e a estabilidade da emulsão da nanoestrutura foram maiores do que da proteína nativa estatisticamente.

Tabela 11. Valores de IAE e ESI para a proteína nativa e para nanoestrutura de β-lg

	Proteína Nativa	**Nanoestrutura**
IAE	$114,64 \pm 3,12^{a}$	$167,86 \pm 3,54^{b}$
ESI	$112,00 \pm 3,46^{a}$	$164,00 \pm 3,46^{b}$

[a-b] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Este resultado indica que a nanoestrutura possui maior atividade interfacial que a proteína nativa. Na emulsão, as proteínas migram através da fase aquosa para a interface, se reorganizando para posicionar os aminoácidos hidrofóbicos na fase oleosa e os hidrofílicos na

fase aquosa. Em seguida, se agregam na superfície, formando um filme viscoelástico em torno da gota de óleo, mantendo a emulsão estável (DICKINSON, 2001).

Sabe-se ainda que as proteínas são moléculas anfifílicas, logo, migram espontaneamente para a interface óleo-água e são capazes de formar filmes altamente viscoelásticos, que suportam choques mecânicos. Dessa forma, é importante ressaltar que as emulsões estabilizadas por proteínas são mais estáveis do que as preparadas com surfactantes de baixa massa molecular, ressaltando sua importância para indústria de alimentos (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). Além disso, a formação de nanoestruturas proteicas depende diretamente do desdobramento da estrutura da proteína, que sofre alterações conformacionais dependentes da composição, concentração, pH e força iônica, alterando as propriedades técnico-funcionais (PATHAK; THASSU, 2009).

O ESI é de maior interesse, uma vez que prova que a nanoestrutura possui maior capacidade de estabilizar a emulsão, sendo uma característica importante em alimentos onde a ligação e a texturização da água são necessárias (HOLT, 2000). Logo, a nanoestrutura ter potencializado estas propriedades técnico-funcionais demonstra seu elevado potencial de aplicação na texturização de produtos alimentícios, especialmente, dos queijos, foco deste trabalho.

5.2. Encapsulamento de quercetina e vitamina B_2 na nanoestrutura de β-lg

A Tabela 12 apresenta a eficiência de encapsulação e capacidade de ligação da quercetina na nanoestrutura de β-lg.

Tabela 12. Valores de Eficiência de Encapsulação (EE %) e Capacidade de Ligação (LC %) da quercetina na nanoestrutura de β-lg

Ensaio	[Q]* na dispersão de nanoproteína ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	Eficiência de Encapsulação – EE (%)	Capacidade de Ligação – LC (%)
1	25,0	$86,47 \pm 1,39^{c}$	$4,09 \pm 0,27^{a}$
2	50,0	$89,94 \pm 0,22^{d}$	$9,34 \pm 1,40^{b}$
3	100,0	$93,25 \pm 1,99^{a}$	$18,67 \pm 1,50^{c}$
4	150,0	$95,10 \pm 0,39^{a,b}$	$31,27 \pm 1,57^{d}$
5	300,0	$96,50 \pm 0,08^{b}$	$35,90 \pm 1,28^{e}$

[a-b-c-d-e] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, realizado para cada coluna/variável.

A eficiência de encapasulação (EE) é a fração do bioativo que foi aprisionado na estrutura proteica, já a capacidade de ligação (LC) é quantidade máxima desse composto que pode ser carreada em uma nanoestrutura (ZOU *et al*., 2016).

Nota-se que para todos os ensaios, valores altos de eficiência de encapsulação foram encontrados, sendo o máximo de 96,5 ± 0,08%. Os ensaios são diferentes estatisticamente pelo teste Tukey, com exceção do ensaio 4, que é semelhante estatisticamente aos ensaios 3 e 5. O valor de LC aumentou gradativamente de acordo com o aumento da eficiência. Isso é esperado, visto que, se a nanoestrutura de β-lg foi capaz de encapsular a quercetina, logo, uma massa final maior de moléculas bioativas encapsuladas deve estar presente no ensaio que apresenta maior índice de eficiência. Os valores de LC foram diferentes estatisticamente pelo teste Tukey e o maior valor foi de 35,90 ± 1,28.

A quercetina é uma molécula de caráter hidrofóbico, assim como, o cálice de ligação da β-lg, por isso, há a afinidade e aumento da capacidade de ligação entre esses compostos. Segundo a literatura, essas interações hidrofóbicas ocorrem entre os anéis aromáticos de quercetina e o cálice hidrofóbico da proteína e entre os resíduos hidrofóbicos existentes na superfície da estrutura proteica (MIRPOOR *et al.*, 2017). Além disso, a capacidade de ligação entre essas moléculas pode ser aumentada por interações eletrostáticas que podem ocorrer entre porções carregadas negativamente da quercetina com resíduos de aminoácidos da nanoestrutura (SAHIHI *et al*., 2012).

Durante o tratamento térmico da proteína para obtenção da nanoestrutura, os sítios de ligação hidrofóbicos, que ficavam encobertos na estrutura proteica, são, então, expostos e aptos para realizarem ligações, aumentando a eficiência de ligação dessa estrutura com compostos hidrofóbicos (SIMÕES *et al*., 2019). Porém, já é bem relatado em literatura que a β-lg pode se associar a compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (ZAGURY *et al*., 2019).

Resultados similares de eficiência foram encontrados por Santos e colaboradores (2019), que encapsularam a quercetina em conjugados de nanoestrutura de β-lg com polissacarídeos, obtendo cerca de 90% de eficiência. Mirpoor e colaboradores (2017) também alcançaram 95,1% de eficiência e 0,93% de LC; Simões e colaboradores (2019) alcançaram 98% de eficiência de encapsulamento e 0,61% de LC de quercetina na nanoestrutura de β-lg. Neste trabalho o LC encontrado foi maior, demonstrando que maior concentração de quercetina pode ser carregada em uma única nanoestrutura de β-lg, sendo um método mais simples e promissor para aumentar a disponibilidade desse bioativo, diminuindo sua

degradação nos processamentos de alimentos e, possivelmente, aumentando a sua biodisponibilidade (MADALENA *et al*., 2016). É importante ressaltar que a atividade antioxidante da quercetina no nanocomplexo é idêntica a da quercetina livre, segundo Kumari e colaboradores (2010), assim, pode ser incorporada a outros produtos sem perder sua integridade.

A Tabela 13 apresenta a eficiência de encapsulação e capacidade de ligação da vitamina B2 na nanoestrutura de β-lg.

Tabela 13. Valores de Eficiência de Encapsulação (EE %) e Capacidade de Ligação (LC %) da vitamina B_2 na nanoestrutura de β-lg

Ensaio	[V]* na dispersão de nanoproteína ($mg \cdot mL^{-1}$)	Eficiência de Encapsulação – EE (%)	Capacidade de Ligação – LC (%)
1	0,015	$36,39 \pm 6.71^{b}$	$3,46 \pm 0,08^{a}$
2	0,030	$34,35 \pm 4,92^{b}$	$3,46 \pm 0,23^{a}$
3	0,060	$12,65 \pm 5,81^{a}$	$3,32 \pm 0,77^{a}$
4	0,075	$7,35 \pm 2,26^{a}$	$3,27 \pm 0,27^{a}$
5	0,090	$5,77 \pm 3,37^{a}$	$3,11 \pm 0,28^{a}$

[a-b]Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey, realizado para cada coluna/variável.

A maior EE da vitamina B_2 foi de 36,39 ± 6.71%. Observa-se que houve diferenças estatísticas significativas entre os ensaios, sendo que os ensaios 1 e 2 são semelhantes estatisticamente, assim como, os ensaios 3, 4 e 5. Mas, nota-se que há um decréscimo na eficiência à medida que aumenta a concentração de vitamina B_2, o que pode ocorrer devido à saturação dos sítios de ligação da nanoestrutura (SIMÕES *et al*. 2019). As interações que ocorrem entre a molécula proteica e a vitamina B_2 são, em sua maioria, interações eletrostáticas e de hidrogênio (LI *et al*., 2019). Madalena e colaboradores (2016) obtiveram 26,1% de eficiência no encapsulamento de vitamina B2 na nanoestrutura de β-lg. É possível inferir que a menor EE por parte destes autores em relação ao obtido neste estudo deve-se à diferença na metodologia de obtenção de nanoestrutura que ocasiona a modificação na exposição de grupos hidrofílicos, facilitando a ligação de moléculas hidrofílicas como a vitamina B2.

A capacidade de ligação (LC) não apresentou diferença estatística, mantendo seu valor em aproximadamente 3,46 ± 0,23%. Diferenças encontradas nesses valores podem estar relacionadas ao método de obtenção da nanonanoestrutura e do encapsulado, relacionando-se

tanto aos reagentes utilizados quanto as condições de temperatura, pH, o tamanho e a forma da nanoestrutura. Porém, não são relatados na literatura valores altos de LC para vitamina B_2, logo, o resultado encontrado é compatível com demais estudos, sendo que neste trabalho não foram necessárias alterações de pH ou qualquer outra condição da nanoestrutura obtida para realizar o encapsulamento, sendo um método simples e eficaz. No trabalho de Simões e colaboradores (2019) foi encontrado LC de 1,8% para encapsulados de nanoestruturas de β-lg e vitamina B_2. Já Azevedo e colaboradores (2014) encontraram LC de 2,2% para nanoestruturas alginato/quitosana carreando vitamina B2.

A dose diária de vitamina B_2 recomendada para adultos é de aproximadamente 1,2 mg. Logo, a eficiência de encapsulamento de 36,39 % fornece promissores resultados para suplementação alimentar, suprindo a deficiência desse nutriente (MADALENA *et al*., 2016).

As capacidades de ligações (LC) podem ser alteradas por mudanças de pH, temperatura, concentração salina, solventes e metodologia de obtenção de nanoestrutura e de encapsulado (HO-KYUNG *et al*., 2013). No caso da quercetina, a literatura relata que, como a afinidade pelo cálice hidrofóbico da proteína de β-lg é alta, a alteração de pH não altera de forma significativa a interação entre essas moléculas (MIRPOOR *et al.*, 2017). Mas, para a vitamina B_2, estes são fatores de relevância, logo, a alteração desse parâmetro pode ocasionar mudança no encapsulamento (MADALENA *et al*., 2016).

Os resultados da caracterização via DLS demonstraram que ao encapsular a molécula de quercetina, houve contração no tamanho da nanoestrutura, que apresentou tamanho de 69,14 ± 7,24 nm e PDI de 0,268 ± 0,017. O mesmo ocorreu para a vitamina B_2, em que o encapsulado apresentou tamanho de 92,21 ± 8,27 nm e PDI de 0,221 ± 0,063. O encapsulado continuou com bom índice de polidispersividade, indicando que houve a formação de complexos homogêneos. A alteração de tamanho é esperada, visto que a ligação da nanoestrutura com outras moléculas acarreta mudanças em sua conformação, devido às interações inter e intra-moleculares realizadas durante a formação dos complexos (SIMÕES *et al*., 2019). Além disso, por ser uma nanoproteína, ao realizar alterações em sua conformação, como ligações com outros compostos, pode se enovelar, via ligações intramoleculares, acarretando diminuição de tamanho (MADALENA *et al*., 2016).

O potencial Zeta do encapsulado com quercetina foi de -26,3 ± 2,06 mV. Logo, houve incremento na estabilidade coloidal da nanoestrutura e a carga superficial se manteve negativa. Esse aumento do potencial Zeta está relacionado à forte interação hidrofóbica entre

a quercetina e o cálice de ligação da β-lg (MIRPOOR *et al.*, 2017), a qual diminui interações que poderiam ocorrer entre as próprias moléculas proteicas, que geravam aglomeração e perda de estabilidade. No caso da vitamina B_2, houve um decréscimo do potencial Zeta (-11,05 ± 3,36 mV), mantendo-se a carga superficial negativa. A vitamina B_2 é uma molécula anfipática, logo, possuí menor afinidade pelo cálice hidrofóbico da proteína e, com isso, possui menor capacidade de ligação, podendo ocasionar interações eletrostáticas e de dissulfeto entre as moléculas proteicas – que buscam estabilidade – e, assim, diminuir o potencial Zeta do sistema (SIMÕES *et al*., 2019)

Assim, os melhores ensaios escolhidos foram: o ensaio 5 para a quercetina, devido ao maior valor de LC, mesmo que não tenha diferença estatística significativa para a EE entre o ensaio 4 e 5; e o ensaio 1 para a vitamina B_2, visto que foi o melhor resultado e com menor concentração de reagente.

Neste trabalho, a técnica de obtenção dos encapsulados é livre de reagentes tóxicos, sendo de grande importância para ser utilizada em processos produtivos nos quais ingredientes GRAS sejam requeridos (MIRPOOR, *et al.*, 2017). Além disso, não foram necessárias alterações na estrutura da nanoproteína obtida para realizar os processos de encapsulamento, destacando a versatilidade desta metodologia e da nanoestrutura, que é uma alternativa promissora para a melhoria funcional dos alimentos. Este estudo é relevante, uma vez que existem poucos estudos aplicando a nanoestrutura de β-lg transportando esses bioativos. Outros estudos mostram que a β-lg em tamanho nanométrico possui maior LC a compostos bioativos do que em sua forma macrométrica, isso porque, o tamanho nanométrico aumenta a relação área/volume da superfície da estrutura (JAFARI; MCCLEMENTS, 2017). Logo, estes bioativos podem ser aplicados concominantemente com a nanoestrutura de β-lg no melhoramento funcional de alimentos altamente consumidos, em especial, dos queijos, conforme realizado neste trabalho.

5.3. Análises físico-químicas do queijo com e sem nanoestrutura de β-lg

A Tabela 14 apresenta o pH dos queijos produzidos via DCCR com e sem nanoestrutura de β-lg.

Tabela 14. Propriedade físico-química pH dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg

Ensaios DCCR	pH	Ensaios Controle	pH
1	$6,58 \pm 0,02^{b,c,d}$	**C1**	$6,80 \pm 0,08^{d,e,f,g,h}$
2	$6,65 \pm 0,06^{b,c,d,e,f}$	**C2**	$6,69 \pm 0,28^{c,d,e,f,g}$
3	$6,61 \pm 0,04^{b,c,d}$	**C3**	$6,85 \pm 0,02^{e,f,g,h}$
4	$6,64 \pm 0,03^{b,c,d,e}$	**C4**	$6,95 \pm 0,06^{h}$
5	$6,87 \pm 0,03^{f,g,h}$	**C5**	$6,87 \pm 0,02^{f,g,h}$
6	$6,30 \pm 0,08^{a}$	**C6**	$6,95 \pm 0,05^{h}$
7	$6,44 \pm 0,04^{a,b}$	**C7**	$6,86 \pm 0,04^{f,g,h}$
8	$6,59 \pm 0,05^{b,c,d}$	**C8**	$6,84 \pm 0,04^{e,f,g,h}$
9	$6,58 \pm 0,05^{b,c}$	**C9**	$6,78 \pm 0,06^{c,d,e,f,g,h}$
10	$6,89 \pm 0,03^{g,h}$		
11	$6,84 \pm 0,03^{g,h}$		
12	$6,87 \pm 0,04^{f,g,h}$		
13	$6,87 \pm 0,02^{g,h}$		
14	$6,87 \pm 0,00^{g,h}$		
15	$6,95 \pm 0,03^{h}$		
16	$6,80 \pm 0,05^{d,e,f,g,h}$		
17	$6,92 \pm 0,03^{h}$		

[a-b-c-d-e-f-g-h] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Alguns ensaios obtiveram diferenças estatísticas significativas pelo Teste Tukey entre os controles e os queijos com nanoestrutura e entre os próprios queijos do planejamento. Essas diferenças podem estar relacionadas à presença de bactérias oriundas do processo produtivo, que diminuem o pH do meio, logo, em queijos com menores pH, pode se ter maior proliferação desses microrganismos (SANGALETTI *et al*., 2009).

De forma geral, o pH não apresentou grande variação, se mantendo na faixa entre 6,30 a 6,95. Dias e colaboradores (2016) obtiveram variações de pH entre 5,4 e 6,7 para queijos artesanais tipo minas frescal. Sangaletti e colaboradores (2009) também avaliaram o pH do queijo minas frescal, seguindo as normativas da legislação brasileira, encontrando alterações numa faixa de 6,66 a 5,85 ao longo de um período de 30 dias de estocagem. Similarmente, Dias e colaboradores (2016) também avaliaram diferentes amostras de queijo tipo minas frescal artesanal e industrial seguindo as regulamentações brasileiras, encontrando variações de pH entre 5,4 a 6,7 para os queijos artesanais. Nota-se que o pH encontrado para os queijos produzidos se enquadram nos parâmetros do Regulamento Técnico para produção de queijo tipo minas frescal. Pelo gráfico de Paretto (Apêndice – Figura A) nota-se que o pH

não foi uma resposta com significância estatística para o DCCR aplicado. Dessa forma, a nanoestrutura e o KCl não alteraram essa propriedade físico química do queijo minas frescal, visto que os valores dos queijos e dos controles ficaram próximos, sendo um fator positivo para sua inserção nos processos produtivos.

A Tabela 15 apresenta os sólidos solúveis totais dos queijos produzidos via DCCR com e sem nanoestrutura de β-lg.

Tabela 15. Propriedade físico-química ºBrix dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg

Ensaios DCCR	ºBrix	Ensaios Controle	ºBrix
1	$1{,}00 \pm 0{,}00^{d}$	**C1**	$0{,}84 \pm 0{,}06^{a,b,c}$
2	$0{,}97 \pm 0{,}06^{c,d}$	**C2**	$0{,}87 \pm 0{,}06^{a,b,c,d}$
3	$1{,}00 \pm 0{,}00^{d}$	**C3**	$0{,}90 \pm 0{,}00^{b,c,d}$
4	$0{,}90 \pm 0{,}00^{b,c,d}$	**C4**	$0{,}77 \pm 0{,}06^{a,b}$
5	$0{,}94 \pm 0{,}06^{c,d}$	**C5**	$0{,}77 \pm 0{,}06^{a,b}$
6	$0{,}77 \pm 0{,}06^{a,b}$	**C6**	$0{,}87 \pm 0{,}06^{a,b,c,d}$
7	$0{,}74 \pm 0{,}06^{a}$	**C7**	$0{,}90 \pm 0{,}00^{b,c,d}$
8	$0{,}90 \pm 0{,}00^{b,c,d}$	**C8**	$0{,}87 \pm 0{,}06^{a,b,c,d}$
9	$0{,}77 \pm 0{,}06^{a,b}$	**C9**	$0{,}87 \pm 0{,}06^{a,b,c,d}$
10	$0{,}97 \pm 0{,}06^{c,d}$		
11	$0{,}97 \pm 0{,}06^{c,d}$		
12	$1{,}00 \pm 0{,}00^{d}$		
13	$0{,}94 \pm 0{,}06^{c,d}$		
14	$1{,}00 \pm 0{,}00^{d}$		
15	$0{,}94 \pm 0{,}06^{c,d}$		
16	$0{,}87 \pm 0{,}06^{a,b,c,d}$		
17	$0{,}90 \pm 0{,}00^{b,c,d}$		

[a-b-c-d]Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0{,}05$ de acordo com o teste de Tukey.

Os queijos apresentaram uma faixa de 0,74 a 1,00 ºBrix, sendo que não houve diferenças significativas entre os próprios ensaios do DCCR e entre os ensaios e os controles pelo Teste Tukey. Similarmente, pelo Gráfico de Paretto (Apêndice – Figura B), o ºBrix não foi uma resposta com significância estatística para o DCCR aplicado. Nesse caso, o resultado indica homogeneidade em relação ao teor de sólidos nos queijos produzidos. Além disso, o queijo minas frescal possui baixo teor de sólidos solúveis, visto que, após a coagulação, onde a gordura e as proteínas são concentradas na coalhada, os sólidos solúveis são removidos no soro (DE PAULA *et al.*,2009).

A Tabela 16 apresenta a acidez titulável dos queijos produzidos via DCCR com e sem nanoestrutura de β-lg.

Tabela 16. Propriedade físico-química acidez titulável (%) dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg

Ensaios DCCR	Acidez Titulável (%)	Ensaios Controle	Acidez Titulável (%)
1	$0,60 \pm 0,02^{a}$	**C1**	$1,12 \pm 0,03^{e,f}$
2	$0,58 \pm 0,00^{a}$	**C2**	$1,09 \pm 0,05^{e,f}$
3	$0,58 \pm 0,07^{a}$	**C3**	$1,06 \pm 0,03^{e}$
4	$0,66 \pm 0,04^{a,b}$	**C4**	$1,13 \pm 0,03^{e,f}$
5	$0,60 \pm 0,02^{a}$	**C5**	$1,19 \pm 0,02^{f}$
6	$0,92 \pm 0,02^{d}$	**C6**	$1,17 \pm 0,08^{e,f}$
7	$0,83 \pm 0,03^{c,d}$	**C7**	$1,09 \pm 0,00^{e,f}$
8	$0,70 \pm 0,03^{a,b}$	**C8**	$1,09 \pm 0,08^{e,f}$
9	$0,79 \pm 0,03^{b,c}$	**C9**	$1,17 \pm 0,12^{e,f}$
10	$0,60 \pm 0,02^{a}$		
11	$0,70 \pm 0,02^{a,b,c}$		
12	$0,68 \pm 0,01^{a,b}$		
13	$0,70 \pm 0,03^{a,b,c}$		
14	$0,65 \pm 0,02^{a}$		
15	$0,60 \pm 0,01^{a}$		
16	$0,66 \pm 0,02^{a,b}$		
17	$0,64 \pm 0,02^{a}$		

[a-b-c-d-e-f] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Os queijos 6 e 7 do planejamento se diferenciaram estatisticamente dos demais, mas são iguais entre si. Os outros são estatisticamente semelhantes pelo teste Tukey. Além disso, pelo Gráfico de Paretto (Apêndice – Figura C), a acidez titulável não foi uma resposta com significância estatística para o DCCR aplicado. Os queijos apresentaram teores reduzidos de ácido lático, sendo estes entre 0,58 a 0,92%. Segundo Cunha (2002), a acidez nos queijos se relaciona a degradação dos resíduos de lactose pela ação de bactérias láticas. Essas bactérias estão presentes no queijo ou por fazerem parte do processo produtivo ou por resistirem ao processo de pasteurização ou por ocorrência de contaminação. Além disso, ainda nos tanques de armazenamento do leite cru, pode haver a degradação da lactose pelas bactérias láticas, refletindo no teor de ácido lático. Sabe-se ainda que o sal nos queijos reduz a atividade de água via aprisionamento destas moléculas na rede proteica, e, consequentemente, auxiliam na diminuição da proliferação de microrganismos (MELO FILHO; VASCONCELOS, 2016). Como os queijos produzidos possuem concentrações consideráveis da mistura de KCl e NaCl,

se justifica o baixo teor de ácido lático, além de que, não foi adicionado fermento ou ácido lático na metodologia de produção. Ainda, nota-se que, pelo baixo valor dessa propriedade, o processo de produção dos queijos foi eficiente quanto a reduzir possíveis contaminações.

A diferença estatística ocorre entre os queijos do planejamento e os controles, os quais apresentam maiores teores de ácido lático variando entre 1,09 e 1,19%. Este decréscimo no teor de ácido lático na presença da nanoestrutura está relacionado à diminuição do teor de umidade, que é ocasionada pela adição na matriz do queijo de compostos de baixa massa molecular (SOARES, 2013), que interferem nos processos de transferência de massa. Ao diminuir a atividade de água, ocorre a redução da proliferação de bactérias, logo, menos ácido lático é produzido. Assim, a adição das nanoestruturas se mostra uma alternativa promissora também para o aumento da vida útil desse produto, que é altamente perecível.

A Tabela 17 apresenta a condutividade elétrica ($mS \cdot cm^{-1}$) dos queijos produzidos via DCCR com e sem nanoestrutura de β-lg.

Tabela 17. Propriedade físico-química condutividade elétrica ($mS \cdot cm^{-1}$) dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg

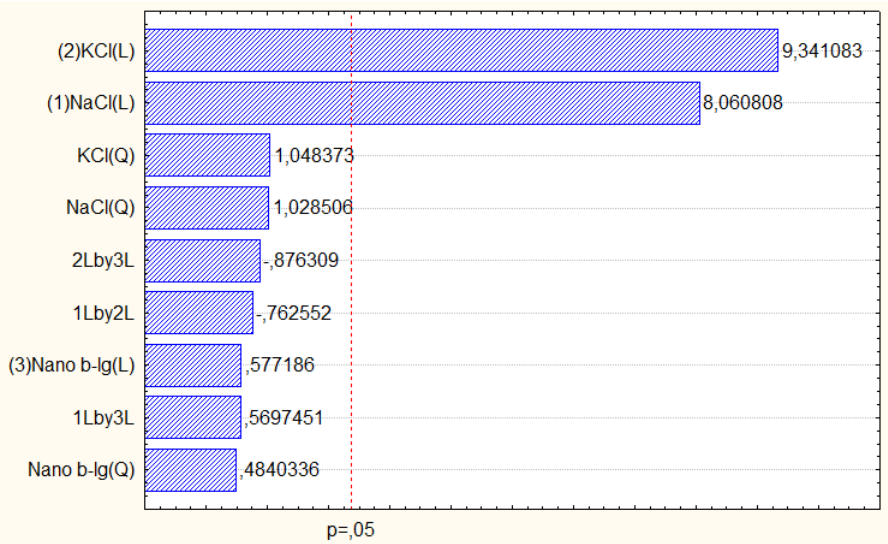
Ensaios DCCR	Condutividade ($mS \cdot cm^{-1}$)	Ensaios Controle	Condutividade ($mS \cdot cm^{-1}$)
1	$2,87 \pm 0,09^{g,h}$	**C1**	$2,98 \pm 0,04^{h,i}$
2	$1,31 \pm 0,04^{a,b}$	**C2**	$1,39 \pm 0,12^{a,b,c}$
3	$3,84 \pm 0,04^{k}$	**C3**	$4,43 \pm 0,06^{l}$
4	$2,28 \pm 0,02^{e}$	**C4**	$2,68 \pm 0,32^{f,g,h}$
5	$2,43 \pm 0,07^{e,f}$	**C5**	$2,61 \pm 0,05^{f,g}$
6	$2,91 \pm 0,07^{g,h}$	**C6**	$1,61 \pm 0,00^{b,c,d}$
7	$1,28 \pm 0,08^{a}$	**C7**	$4,14 \pm 0,16^{k,l}$
8	$3,92 \pm 0,07^{k}$	**C8**	$4,41 \pm 0,02^{l}$
9	$2,82 \pm 0,05^{g,h}$	**C9**	$1,76 \pm 0,08^{d}$
10	$2,41 \pm 0,09^{e,f}$		
11	$1,68 \pm 0,07^{c,d}$		
12	$3,34 \pm 0,07^{j}$		
13	$3,28 \pm 0,03^{i,j}$		
14	$3,28 \pm 0,08^{d}$		
15	$2,40 \pm 0,09^{e,f}$		
16	$2,40 \pm 0,09^{e,f}$		
17	$2,40 \pm 0,08^{e,f}$		

[a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey.

Houve diferença estatística entre os ensaios do planejamento DCCR pelo teste Tukey. Os queijos com maiores concentrações de sal (ensaios 3, 8, 12 e 13) apresentaram maior condutividade, sendo estas 3,84; 3,92; 3,34 e 3,38 $mS \cdot cm^{-1}$. Enquanto os queijos com menores concentrações salinas (ensaios 2 e 7) apresentaram menor condutividade, sendo 1,31 e 1,28 $mS \cdot cm^{-1}$.

A Figura 10 apresenta o Gráfico de Pareto para a condutividade elétrica dos queijos com nanoestrutura de β-lg.

Figura 10. Gráfico de Pareto para condutividade elétrica do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



A concentração de KCl e NaCl são significativos linearmente. Nota-se que o KCl é a variável com maior impacto no valor da condutividade, mesmo que tenha sido bem próximo ao NaCl. Isso ocorre porque o KCl apresenta maior condutividade molar, em diluição infinita em água, que o NaCl, sendo 14,986 $S.cm^2.mol^{-1}$ e 12,645, respectivamente $S.cm^2.mol^{-1}$ (BALD *et al.*, 2013).

A Tabela 18 representa a ANOVA do modelo apresentado para a condutividade elétrica do queijo com nanoestrutura de β-lg.

Tabela 18. ANOVA da variável resposta condutividade elétrica do DCCR do queijo com nanoestrutura de β-lg

Fator	SS	Df	MS	F	P
(1)NaCl (L)	3,884171	1	3,884171	64,97663	0,000087
NaCl (Q)	0,063235	1	0,063235	1,05782	0,337934
(2) KCl (L)	5,215977	1	5,215977	87,25583	0,000033
KCl (Q)	0,065701	1	0,065701	1,09909	0,329309
(3)Nano b-Lg (L)	0,019915	1	0,019915	0,33314	0,581893
Nano b-Lg (Q)	0,014005	1	0,014005	0,23429	0,643138
1L by 2L	0,034760	1	0,034760	0,58149	0,470641
1L by 3L	0,019405	1	0,019405	0,32461	0,586661
2L by 3L	0,045904	1	0,045904	0,76792	0,409924
Erro	0,418446	7	0,059778		
Total SS	9,746311	16			

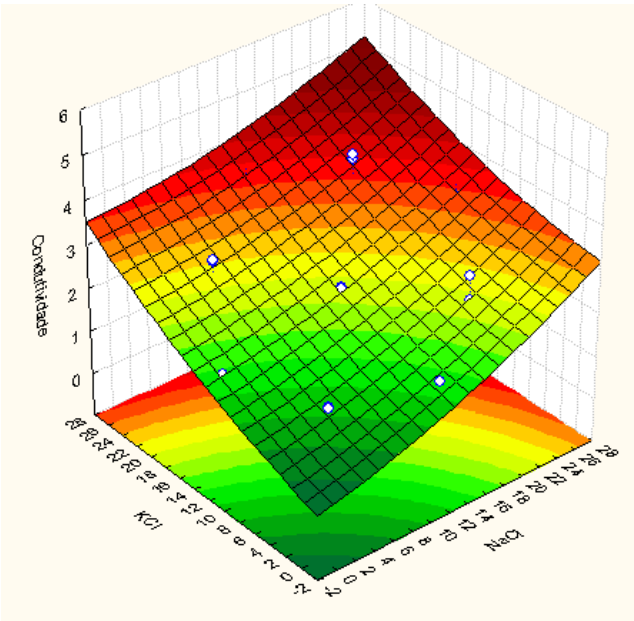
L (Linear); Q (Quadrática).

A ANOVA avalia o impacto de um ou mais fatores comparando com as médias das variáveis de resposta em diferentes níveis dos fatores. Os modelos utilizados foram o linear e quadrático. Logo, os maiores valores de F foram para o KCl e, portanto, é o grande influenciador na obtenção do valor da condutividade elétrica, sendo altos valores destes prejudiciais para o processo, visto que o KCl gera gosto amargo nos queijos quando em excesso (GUINEE; FOX, 2004). Já o valor de p mostra a confiabilidade do teste para a variável resposta condutividade, quanto menor este valor menor a probabilidade dos resultados serem algo ao acaso, neste caso, os valores de p foram pequenos, salientando a confiabilidade do modelo. A relação entre o $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ é o que possibilita a análise de significância estatística dos dados. Sendo assim obteve-se o valor de $F_{calculado}$ igual a 156,04 e $F_{tabelado}$ igual a 3,79, como $F_{calculado} > F_{tabelado}$, pôde-se concluir que os dados são estatisticamente significativos.

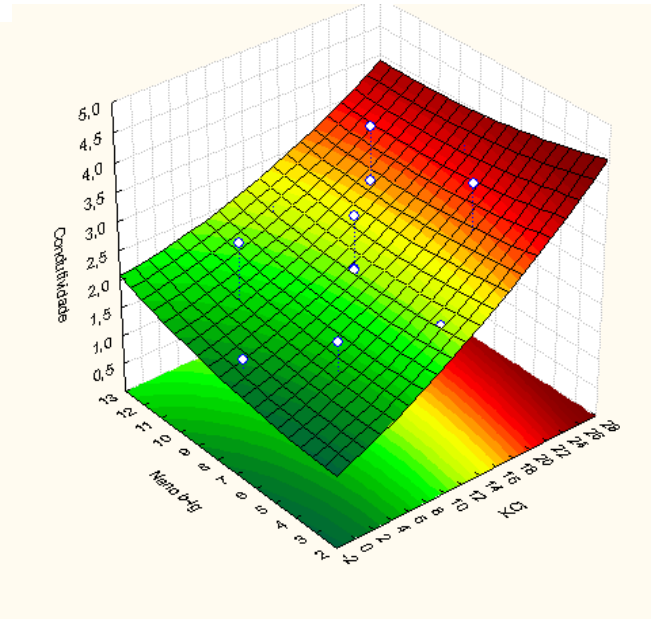
Entretanto, busca-se por regiões com menores valores de condutividade, que implicam diretamente no menor teor de sal nos queijos para este trabalho, conforme pode ser observado nas superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 11 (a; b; c). As superfícies em 2D estão no Apêndice (Figuras J, K e L).

Figura 11. Superfície de resposta do DCCR de três fatores com a variável dependente condutividade elétrica em função da variável codificada (a) concentração de NaCl e KCl; (b) concentração de KCl e da nanoestrutura de β-lg; (c) concentração de NaCl e da nanoestrutura de β-lg

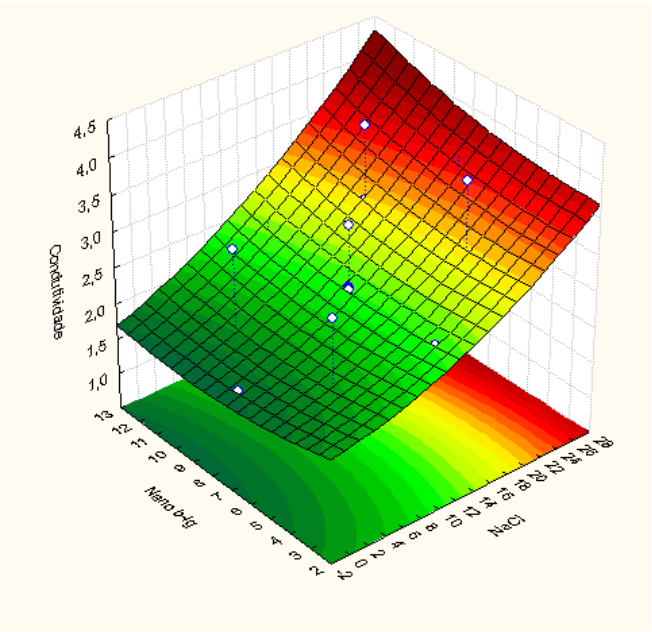
(a)



(b)



(c)



As superfícies auxiliam na otimização do processo, indicando quais variáveis podem ser modificadas e os possíveis efeitos das variáveis na condutividade elétrica. Na Figura 11(a), os maiores valores de condutividade elétrica são justamente alcançados quando se aplica os ensaios com maiores teores de KCl e NaCl. Neste trabalho, se busca valores intermediários de condutividade, visto que se almeja a redução do sódio e ao mesmo tempo entende-se a importância dos sais nas propriedades físico-químicas dos queijos, como na atividade de água, na textura, sabor, aroma e preservação.

Nas Figuras 11(b) e 11(c) observa-se o mesmo comportamento. Nota-se a região verde como a região ideal de trabalho pelos menores valores de condutividade elétrica e valores intermediários para a nanoestrutura. Este é o ponto objetivo deste estudo, pois apresenta concentração moderada de sal e da proteína.

Há diferenças significativas pelo teste Tukey na condutividade elétrica dos queijos do ensaio com os queijos controle (Tabela 17). O controle C3 apresenta uma condutividade elétrica maior que os ensaios 3 e 8, apesar da mesma concentração de sal. O mesmo ocorre para os controles C7 e C8 quando comparados aos ensaios 12 e 13. Assim, percebe-se que o uso da nanoestrutura atingiu o objetivo central deste trabalho que é reduzir o teor de sal no queijo minas frescal quando avaliada a condutividade elétrica dos queijos. Neste caso, justamente como já citado acima, ao adicionar um componente de baixa massa molecular à massa de queijo, dificulta-se o processo de transferência de massa, logo, as moléculas de sal podem ter ficado retidas entre as moléculas de nanoestrutura, diminuindo a condutividade.

5.4. Análise do Perfil de Textura do Queijo

5.4.1. Análise de Firmeza

A Tabela 19 apresenta a firmeza lateral e superior dos queijos do DCCR e dos queijos controle.

Tabela 19. Perfil médio de textura instrumental a partir da análise de firmeza, lateral e superior dos queijos com nanoestruturas de β-lg com diferentes concentrações de NaCl e KCl, seguindo o DCCR e dos queijos controle isentos de nanoestrutura de β-lg

Ensaios DCCR	Firmeza Lateral (N)	Firmeza Superior (N)	Ensaios Controle	Firmeza Lateral (N)	Firmeza Superior (N)
1	$2,79 \pm 0,05^{f,g}$	$3,31 \pm 0,16^{f,g,h,i,j}$	**C1**	$1,41 \pm 0,23^{a,b,c}$	$1,89 \pm 0,08^{c,d}$
2	$2,10 \pm 0,10^{d,e}$	$2,68 \pm 0,19^{e,f}$	**C2**	$1,70 \pm 0,22^{b,c,d}$	$1,92 \pm 0,05^{c,d}$
3	$2,83 \pm 0,09^{f,g}$	$3,03 \pm 0,11^{e,f,g}$	**C3**	$1,01 \pm 0,05^{a}$	$1,57 \pm 0,13^{a,b,c}$
4	$3,08 \pm 0,27^{g,h}$	$3,71 \pm 0,39^{g,h,i,j,k}$	**C4**	$1,12 \pm 0,1^{a,b}$	$1,17 \pm 0,03^{a,b}$
5	$2,64 \pm 0,33^{e,f,g}$	$3,37 \pm 0,15^{g,h,i,j}$	**C5**	$1,46 \pm 0,18^{a,b,c}$	$1,82 \pm 0,14^{b,c,d}$
6	$2,54 \pm 0,38^{e,f,g}$	$3,05 \pm 0,08^{e,f,g,h}$	**C6**	$1,73 \pm 0,07^{c,d}$	$1,64 \pm 0,27^{a,b,c}$
7	$2,34 \pm 0,22^{e,f}$	$3,25 \pm 0,31^{f,g,h,i,j}$	**C7**	$0,95 \pm 0,08^{a}$	$1,09 \pm 0,14^{a}$
8	$2,47 \pm 0,14^{e,f}$	$3,15 \pm 0,33^{e,f,g,h,i}$	**C8**	$1,70 \pm 0,05^{b,c,d}$	$1,84 \pm 0,09^{b,c,d}$
9	$2,39 \pm 0,15^{e,f}$	$2,49 \pm 0,04^{d,e}$	**C9**	$1,28 \pm 0,09^{a,b,c}$	$1,45 \pm 0,07^{a,b,c}$
10	$2,62 \pm 0,28^{e,f,g}$	$3,09 \pm 0,06^{e,f,g,h}$			
11	$2,44 \pm 0,17^{e,f}$	$3,04 \pm 0,21^{e,f,g}$			
12	$3,57 \pm 0,05^{h,i}$	$4,07 \pm 0,12^{k}$			
13	$3,12 \pm 0,30^{g,h}$	$3,90 \pm 0,35^{j,k}$			
14	$3,75 \pm 0,27^{j}$	$3,79 \pm 0,42^{i,j,k}$			
15	$3,09 \pm 0,20^{g,h}$	$4,16 \pm 0,20^{k}$			
16	$3,11 \pm 0,15^{g,h}$	$3,74 \pm 0,34^{h,i,j,k}$			
17	$2,78 \pm 0,04^{f,g}$	$3,17 \pm 0,27^{e,f,g,h,i}$			

$^{a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k}$ Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey para a variável resposta Firmeza Superior e variável resposta Firmeza Lateral.

A firmeza é uma medida importante na análise dos queijos, pois, está diretamente relacionada ao sensorial e à qualidade final do produto. No geral, não houve diferença significativa entre os ensaios do planejamento DCCR, com exceção dos ensaios 2 e 14 da Firmeza Lateral, que se diferenciaram. Os ensaios 12 e 15 da Firmeza Superior também se diferenciaram estatisticamente dos demais, mas são semelhantes entre si. O gráfico de Pareto (Apêndice – Figuras D e E) demonstra que os valores de firmeza não foram variáveis interferentes no modelo. Este fato indica que, mesmo com a adição de nanoestrutura e variação das concentrações de sais, os ensaios mantiveram uma homogeneidade de firmeza,

sendo um ponto positivo, uma vez que alterações drásticas dessa propriedade do queijo poderiam levar a não aceitação pelo consumidor.

É importante ressaltar que não foram observadas mudanças de firmeza em ensaios com maiores concentrações de KCl em relação a NaCl. Alguns estudos na literatura relatam alterações neste parâmetro, quando a substituição do sódio pelo potássio ocorre acima de 75%, pois, se pode aumentar a proteólise no produto final, alterando diretamente a cadeia proteica, afetando a densidade da matriz, que dá estrutura e firmeza aos queijos, principalmente, em queijos maturados (SOARES, 2013). Segundo Fang e colaboradores (2016), queijos com maior quantidade de água, são mais suaves e possuem menor firmeza; já os queijos com baixa umidade, possuem maior volume proteico e firmeza (FANG *et al*., 2016).

Neste caso, o ensaio 11 do DCCR, que é isento de NaCl, a firmeza apresentou resultados satisfatórios, semelhante a outros autores que aplicaram a substituição do NaCl por KCl, para algumas variedades de queijo, como Minas Padrão, Muçarela, Halloumi, Feta (BUENO COSTA *et al*., 2018; CHAVHAN *et al*., 2015; KATSIARI *et al,* 1997,1998; KAMLEH *et al*., 2012). Acredita-se ainda que as diferenças que podem haver entre os ensaios de textura de queijos de diferentes trabalhos se deve ao próprio método de fabricação do produto, como por exemplo, a temperatura de coagulação, o tempo de mexedura e as concentrações de matéria-prima (CARVALHO *et al.*, 2007).

Houve diferença significativa entre os queijos com e sem nanoestrutura, pelo teste Tukey. Os queijos sem nanoestrutura apresentaram menor firmeza (0,86 a 1,80 N) tanto superior quanto lateral, quando comparado aos queijos com nanoestrutura (2,14 a 4,34 N). Este resultado corrobora com as propriedades técnico-funcionais de espuma e emulsão da nanoestrutura de β-lg. Assim, a nanoestrutura foi capaz de melhorar a firmeza do queijo, provavelmente, pela nanoestrutura ter cadeia proteica mais flexível que melhora as interações e extensões na interface líquido-ar, o que potencializa a gelificação e a textura do queijo (MISHRA; MANN; JOSHI, 2001).

5.4.2. Análise Instrumental do Perfil de Textura (TPA)

A Tabela 20 e 21 apresenta a TPA dos queijos com e sem nanoestrutura β-lg, respectivamente.

Tabela 20. Análise Instrumental de Textura dos queijos com diferentes concentrações de nanoestruturas de β-lg, NaCl e KCl, seguindo o DCCR, em função das variáveis de resposta Coesividade, Adesividade (g.s), Elasticidade, Mastigabilidade (N), Dureza (N)

Ensaio	Coesividade	Adesividade (g.s)	Elasticidade	Mastigabilidade (N)	Dureza (N)
1	0,6934	-3,7875	0,7779	46,2424	85,7281
2	0,7300	-5,5016	0,8258	43,4630	72,0925
3	0,7781	-0,7022	0,8283	41,7737	64,8172
4	0,7474	-3,1866	0,7950	39,6590	66,7449
5	0,7916	-2,0746	0,8038	36,0204	76,1360
6	0,6341	-10,0612	0,7711	33,7630	69,0546
7	0,6581	-4,3749	0,7720	43,7702	86,1450
8	0,7126	-1,6851	0,7763	53,2121	96,1853
9	0,7468	-1,9391	0,7863	55,9334	95,2504
10	0,7259	-2,1943	0,8019	38,8408	73,8437
11	0,7203	-37,2442	0,8325	55,6475	92,7955
12	0,7873	-3,1688	0,8465	50,2940	75,4590
13	0,7648	-0,1119	0,8094	43,8309	70,8047
14	0,6155	-9,6918	0,8091	53,7861	98,0011
15	0,7426	-2,7544	0,7920	52,8128	89,7937
16	0,7718	-1,5678	0,7631	51,3175	87,1355
17	0,8125	-2,2523	0,8108	44,7319	66,8180

Tabela 21. Análise Instrumental de Textura dos queijos controle – isentos da nanoestrutura de β-lg, em função das variáveis de resposta Coesividade, Adesividade (g.s), Elasticidade, Mastigabilidade (N), Dureza (N)

Ensaio	Coesividade	Adesividade (g.s)	Elasticidade	Mastigabilidade (N)	Dureza (N)
1	0,7377	-2,2837	0,8244	49,5975	81,5498
2	0,4875	-7,9372	0,7868	35,3535	92,1619
3	0,4701	-3,7003	0,8215	35,4188	91,7287
4	0,5214	-1,5479	0,7928	29,9542	72,4634
5	0,5356	-15,1146	0,7662	34,0250	84,8416
6	0,6077	-23,8696	0,8208	45,0100	90,2445
7	0,5745	-4,0059	0,7448	35,9423	78,5201
8	0,6191	-4,4257	0,7968	54,4398	114,7814
9	0,4664	-6,8780	0,8728	62,6258	153,845

A TPA simula as compressões realizadas em um pedaço de queijo ao ser mastigado, gerando um perfil de força por tempo que determina as propriedades mecânicas (GUNASEKARAN; AK, 2003).

Os queijos são materiais viscoelásticos, porém, vários fatores interferentes no processo produtivo podem alterar sua composição físico-química, e, por consequência, alterar sua textura, como os teores de proteína, água, gordura, concentrações salinas e pH (NETO, 2006).

A variável resposta coesividade se relaciona com a deformação suportada pelo material antes de sofrer a ruptura proveniente da mastigação, ou seja, representa o quanto a massa se mantém unida na boca durante este processo (MOREIRA, 2018). O gráfico de Pareto do Apêndice (Figura F) demonstra que os valores de coesividade não foram interferentes no DCCR. Este fato indica que, mesmo com a adição de nanoestrutura e variação das concentrações de sais, os ensaios mantiveram uma homogeneidade, com valores entre 0,6155 a 0,8125, sendo um ponto positivo, uma vez que alterações drásticas nesta propriedade poderiam levar a modificação do produto final.

Estes valores corroboram com a literatura, visto que Piazzon-Gomes e colaboradores (2010) obtiveram 0,6272 de coesividade para o queijo minas frescal; e Diamantino (2013) obteve 0,87 de coesividade para o queijo minas frescal tradicional com leite integral. Bueno Costa e colaboradores (2018) produziram queijo coalho com a proporção 1:1 de NaCl e KCl e encontraram valores de coesividade na faixa de 0,81; Borges e colaboradores (2019),

alcançaram o valor de 0,67 para coesividade na produção de queijo tipo minas frescal a partir de leite de ovelha.

Ao se comparar os queijos com nanoestrutura de β-lg com os queijos controle, observa-se que, para a mesma concentração de sal, os queijos com nanoestrutura conseguiram manter maior coesividade. Por exemplo, os ensaios 2 e 7 do DCCR apresentaram média de coesividade de 0,6941, já o controle C2, que possuí a mesma proporção de NaCl e KCl, apresentou 0,4875. O mesmo ocorre com os ensaios 3 e 8, quando comparados ao controle C3. Assim, acredita-se que a nanoestrutura de β-lg tenha sido capaz de manter os níveis de cálcio na massa do queijo, diminuindo a proteólise e mantendo os valores de coesividade.

A variável resposta elasticidade se relaciona com a capacidade do material retornar a posição original após sofrer uma compressão (MOREIRA, 2018). O gráfico de Pareto do Apêndice (Figura H) demonstra que os valores de elasticidade não foram interferentes no planejamento experimental DCCR. Os parâmetros elasticidade e coesividade se relacionam, já que quanto mais elástico for o queijo, maior será sua resistência à ruptura, logo, sua coesividade (SOARES, 2013).

Os valores de elasticidade dos ensaios do DCCR se mantiveram entre 0,7631 e 0,8465. Estes valores corroboram com a literatura, visto que Piazzon-Gomes e colaboradores (2010) obtiveram 0,9175 de elasticidade para o queijo minas frescal tradicional e Diamantino (2013) 0,89 de elasticidade para o queijo minas frescal tradicional com leite integral.

O ensaio 12, que apresenta maior concentração de NaCl, foi o ensaio com maior elasticidade (0,8465), sendo que o esperado é que fosse o menor valor, visto que elevados teores de NaCl podem causar aumento da dilatação da rede proteica, pois, mais água fica retida entre as moléculas salinas, reduzindo a elasticidade do queijo, tornando-o mais quebradiço (SOARES, 2013). A água quando se liga à caseína, funciona como plasticizante, ou seja, um lubrificante da rede proteica, o que confere à matriz proteica menor elasticidade, tornando-a mais susceptível à ruptura e menos firme (KIKUCHI, 2008). Provavelmente, o NaCl não está livre para fazer essa dilatação da rede proteica do queijo, mas sim encapsulado na nanoestrutura de β-lg, o que interfere nos processos de transferência de massa, podendo diminuir a atividade de água e, consequentemente, o teor de umidade, mantendo os valores de elasticidade. Além de que, como comprovado neste trabalho, a nanoestrutura possui capacidade de estabilização de emulsão, que também interfere neste parâmetro. O mesmo

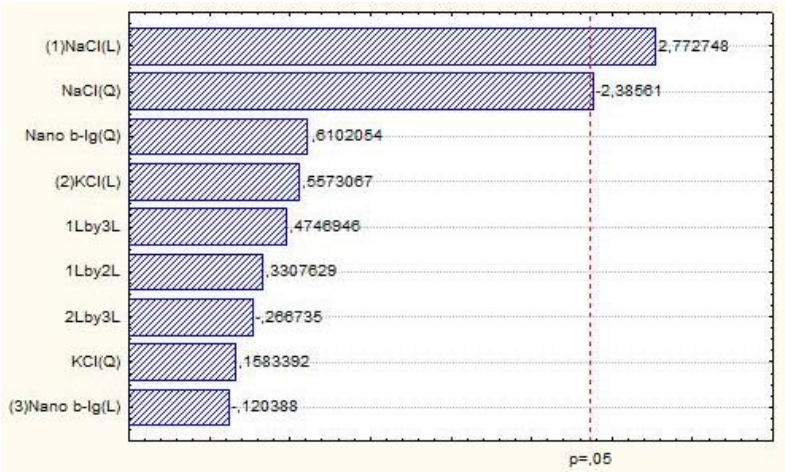
comportamento pode ser observado ao comparar o queijo 12 do DCCR com o queijo 7 do controle. Nota-se, que, no controle, que é isento de nanoestrutura, o valor de elasticidade deste queijo com maior teor de NaCl é menor que os demais.

Nota-se que para todos os ensaios do DCCR obteve-se valores altos de dureza e, consequentemente, de mastigabilidade e ambos não foram interferentes no planejamento experimental DCCR (Apêndice – Figuras G e I) . Piazzon-Gomes e colaboradores (2010) encontraram dureza em torno de 15 N para o queijo Minas frescal adicionado de extrato solúvel de soja. Queiroga e colaboradores (2013) estudaram as propriedades de textura de queijo Coalho produzido com leite de diferentes espécies e obtiveram, para o queijo produzido com leite de vaca, valores de dureza de aproximadamente 20 N. Já Bueno Costa e colaboradores (2018) encontraram valores de dureza em torno de 39,86 N para queijo coalho composto de 1:1 de NaCl e KCl. Estes resultados podem ser justificados pelo fato do queijo minas frescal ser altamente heterogêneo, com diferenças em seu processo produtivo e parâmetros operacionais, seja por pequenos, médios ou grandes produtores (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Sendo assim, esses parâmetros da textura são influenciados por fatores como a composição do leite utilizado, os níveis de umidade e gordura, as concentrações salinas aplicadas, a presença de fermento lático ou não e o tipo de coagulante (SOARES, 2013).

Os queijos controle também apresentaram valores semelhantes para essas variáveis respostas. O ensaio 13 do DCCR possui a mesma concentração salina do controle C8 e apresentou menor dureza. Logo, observa-se a interferência da nanoestrutura de β-lg na atenuação da textura do queijo.

A variável resposta Adesividade se relaciona a força necessária para retirar o queijo do palato enquanto ocorre a mastigação (MOREIRA, 2018). Para esta resposta houve interferência estatística no DCCR, conforme Figura 12.

Figura 12. Gráfico de Pareto para adesividade do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



O NaCl é a variável com maior impacto na adesividade. Isso ocorre porque o sódio interfere diretamente na dissolução de cálcio, ocasionando interferências na matriz proteica, principalmente, na caseína (FELICIO *et al*., 2016). O sódio realiza troca catiônica com íons cálcio insolúveis na matriz proteica (NAGYOVÁ *et al*., 2014), assim, sua aplicação no processo produtivo favorece a peptização da cadeia proteica, dispersão e hidratação das proteínas, além da emulsificação e estabilização da gordura (HOFFMANN *et al*., 2012), sendo fatores que afetam diretamente a textura do produto (FERRÃO *et al*., 2016).

A Tabela 22 representa a ANOVA do modelo apresentado para a adesividade do queijo com nanoestrutura de β-lg.

Os maiores valores de F foram para o NaCl e, portanto, é o grande influenciador na adesividade, corroborando com o Gráfico de Pareto. Já o valor de p mostra a confiabilidade do teste para a variável resposta adesividade, quanto menor este valor menor a probabilidade dos resultados serem algo ao acaso, neste caso, os valores de p foram pequenos, salientando a confiabilidade do modelo. A relação entre o $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ é o que possibilita a análise de significância estatística dos dados. Sendo assim obteve-se o valor de $F_{calculado}$ igual a 14,51 e $F_{tabelado}$ igual a 2,66, como $F_{calculado} > F_{tabelado}$, pôde-se concluir que os dados são estatisticamente significativos.

Tabela 22. ANOVA da variável resposta adesividade do DCCR do queijo com nanoestrutura de β-lg

Fator	SS	Df	MS	F	P
(1)NaCl (L)	395,572	1	395,5718	7,688133	0,027585
NaCl (Q)	292,821	1	292,8207	5,691114	0,048481
(2) KCl (L)	15,981	1	15,9806	0,310591	0,594681
KCl (Q)	1,290	1	1,2900	0,025071	0,878661
(3)Nano b-Lg (L)	0,746	1	0,7457	0,014493	0,907558
Nano b-Lg (Q)	19,158	1	19,1583	0,372351	0,561005
1L by 2L	5,629	1	5,6291	0,109404	0,750504
1L by 3L	11,594	1	11,5940	0,225335	0,649457
2L by 3L	3,661	1	3,6607	0,071147	0,797360
Erro	360,166	7	51,4523		
Total SS	9,746311	16			

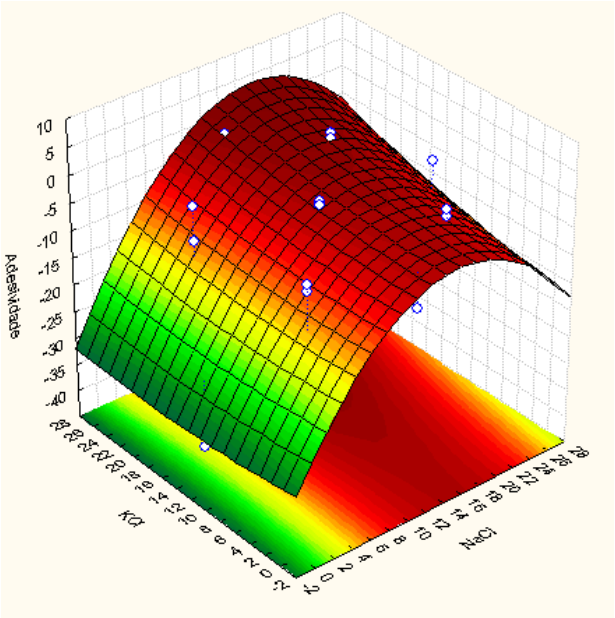
L (Linear); Q (Quadrática).

Entretanto, busca-se por regiões com valores intermediários de adesividade, que implicam diretamente nas características do queijo minas frescal ideal, que deve ser úmido, com cor branca, com massa homogênea e que apresente maciez (OLIVEIRA *et al*., 2017). Pode-se observar as superfícies de resposta nas Figuras 13 (a; b; c). As superfícies em 2D estão no Apêndice (Figuras M, N e O).

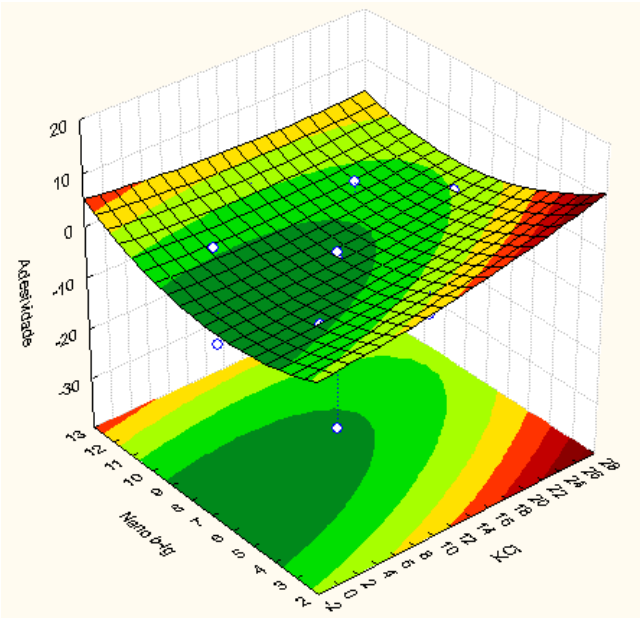
Os valores intermediários de adesividade são justamente alcançados quando se aplica os ensaios com concentrações salinas também intermediárias (Figura 14(a)). Nas Figuras 14(b) e (c), observa-se o mesmo comportamento. Nota-se a região amarela, como a região ideal de trabalho, onde se tem valores intermediários de adesividade, sais e nanoestrutura. Este é o ponto objetivo deste estudo, pois apresenta concentração moderada de sal e da proteína.

Figura 13. Superfície de resposta do DCCR de três fatores com a variável dependente adesividade em função da variável codificada (a) concentração de NaCl e KCl; (b) concentração de KCl e da nanoestrutura de β-lg; (c) concentração de NaCl e da nanoestrutura de β-lg

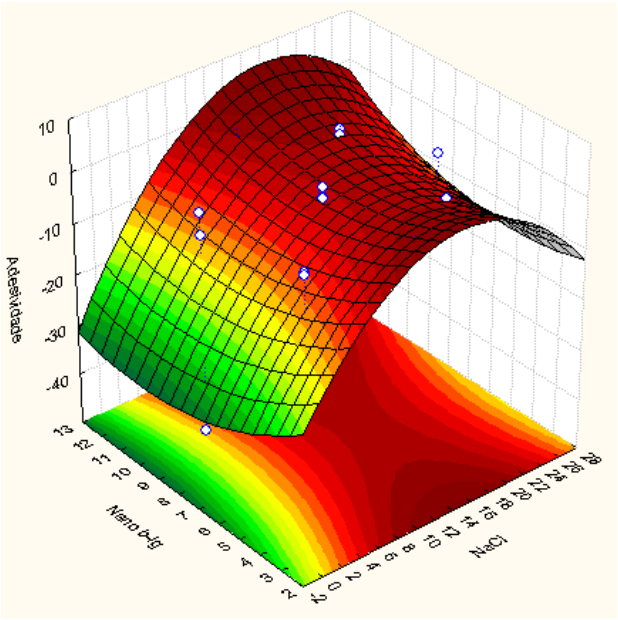
(a)



(b)



(c)



Ainda é possível observar que o ensaio 11, que é isento de NaCl e possuí somente KCl, foi o ensaio que apresentou maior valor de adesividade, afetando negativamente a textura do queijo. Este resultado corrobora com Alvarenga e colaboradores (2008), que ao estudar a substituição do NaCl pelo KCl, notou que elevadas porcentagens de substituição, acima de 75%, gerava o endurecimento da massa do queijo. Tal fato pode ocorrer devido ao retardamento da proteólise da caseína, que se relaciona diretamente com a interação sódio e cálcio e ao aumento do efeito de desidratação nos queijos com a redução do NaCl (AYYASH; SHAH, 2010; SOARES, 2013).

Ao se comparar os queijos com e sem nanoestrutura, nota-se este mesmo comportamento, visto que o controle C6, composto somente por KCl também apresentou o maior adesividade. Além disso, observa-se novamente a atuação da nanoestrutura de β-lg como um composto de baixa massa molecular, interferente nos processos de transferência de massa, consequentemente, na retenção de sal e água, visto que comparando os controles com os ensaios DCCR com a mesma concentração salinas, os ensaios do DCCR apresentaram valores menores de adesividade. Assim, a nanoestrutura comprova mais uma vez suas propriedades técnico-funcionais de estabilização de espuma e emulsão, tornando a massa de queijo firme, porém, com suavidade.

Ainda é válido ressaltar que, visualmente e durante a manipulação dos queijos controles, era possível observar que os ensaios com maior concentração salina eram mais quebradiços, o que condiz com a literatura, que traz que, queijos com teores de sódio

medianos apresentam textura firme; os com baixos teores de sódio são mais cremosos e os com excesso de sódio ficam duros e quebradiços (GUINEE; FOX, 2004). Porém, os queijos com nanoestrutura, mesmo em maiores concentrações salinas, mantiveram-se firmes e não quebradiços, provavelmente pelo encapsulamento do NaCl. Logo, a adição da nanoestrutura de β-lg trouxe modificações positivas para o produto, demonstrando o potencial da redução/substituição do NaCl sem alterar a textura do queijo tipo minas frescal e ainda mantendo-o com níveis reduzidos de ácido lático.

A escolha do ponto central como melhor ensaio se deve a significância estatística da condutividade e adesividade. Os ensaios 2 e 7, com 1% de sal, são os com menores teores de sal, mas, sabe-se que o paladar pode não agradar aos consumidores, conforme relatado por Bueno Costa e colaboradores (2018). Logo, o ponto central, que apresenta 2,5% de sal, sendo 50% NaCl e 50% KCl e 7,5 $mg \cdot kg^{-1}$ de nanoestrutura se mostra uma alternativa viável, visto que apresentaram valores reduzidos de condutividade ao se compararem com o controle, pH, sólidos solúveis e ácido lático dentro do esperado e textura firme. Assim, esse foi o ensaio utilizado para a produção dos queijos com bioativos.

Portanto, foi possível realizar a substituição parcial do NaCl pelo KCl e a adição da nanoestrutura sem trazer alterações significativas para as propriedades físico-químicas e de textura do queijo minas frescal. É importante ressaltar, a importância desses resultados como uma tecnologia inovadora, visto que não há, até o momento, relatos na literatura de adição de nanoestruturas de β-lg na matriz do queijo minas frescal. Além disso, os queijos produzidos apresentam aspectos que se enquadram dentro da legislação brasileira para produção de queijo tipo minas frescal, visto que foi produzido com os ingredientes obrigatórios: leite e coalho; com os ingredientes adicionais: cloreto de cálcio e cloreto de sódio; apresentando coloração branca, sem crosta, com odor suave e característico e textura firme (BRASIL, 2004). Para total regulamentação, faz-se necessária a análise microbiológica, definição do teor de umidade e de gordura e análise sensorial.

5.5. Análises Físico-químicas e de Textura dos Queijos com Encapsulados

A Tabela 23 apresenta as propriedades físico-químicas dos queijos produzidos com nanoencapsulados de quercetina; vitamina B2 e dos queijos controle – isentos de bioativos.

Tabela 23. Análises físico-químicas dos queijos com nanoencapsulados de quercetina; de vitamina B_2 e controle – isento de bioativo, em função de pH, sólidos solúveis totais (ºBrix), acidez titulável (%), condutividade ($mS \cdot cm^{-1}$)

Ensaio	pH	ºBrix	Acidez Titulável (%)	Condutividade ($mS \cdot cm^{-1}$)
Quercetina	$6,45 \pm 0,13^{a}$	$0,90 \pm 0,0^{a}$	$0,61 \pm 0,05^{a}$	$2,43 \pm 0,05^{a}$
Vitamina B_2	$6,63 \pm 0,14^{a,b}$	$0,90 \pm 0,0^{a}$	$0,62 \pm 0,01^{a}$	$2,40 \pm 0,05^{a}$
Controle	$6,89 \pm 0,03^{b}$	$0,94 \pm 0,04^{a}$	$0,62 \pm 0,02^{a}$	$2,41 \pm 0,02^{a}$

$^{a-b}$ Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey para a variável resposta pH, ºBrix, Acidez Titulável e Condutividade.

Não houve diferenças estatísticas significativas no pH entre o controle e os queijos produzidos com bioativos. O pH se manteve na faixa entre 6,45 a 6,89, valores próximos ao pH encontrado por Dias e colaboradores (2016) ao avaliaram queijos artesanais tipo Minas Frescal (5,4 e 6,7).

Similarmente, os queijos não apresentaram diferenças significativas de sólidos solúveis entre os queijos com bioativos e o controle, indicando a homogeneidade em relação ao teor de sólidos nos queijos produzidos.

Os queijos são estatisticamente semelhantes em relação à acidez titulável pelo teste Tukey. Foi possível manter baixo o valor dessa propriedade, mesmo com a adição dos bioativos, o que está relacionado à diminuição do teor de umidade, que é ocasionada pela adição na matriz do queijo de compostos de baixa massa molecular (SOARES, 2013), que interferem nos processos de transferência de massa, como é o caso da nanoestrutura. Além disso, indica que o processo produtivo foi eficiente quanto a reduzir possíveis fontes de contaminação, que podem gerar o aumento do teor de ácido lático via fermentação de bactérias láticas (CUNHA, 2002).

No parâmetro de condutividade, ocorreu o esperado, visto que os três ensaios possuem a mesma concentração salina, logo, não apresentaram diferenças estatísticas pelo teste Tukey. Neste caso, mesmo a nanoestrutura estando conjugada com o bioativo, foi um importante componente de baixa massa molecular adicionado à massa de queijo, dificultando o processo de transferência de massa e, provavelmente, retendo com a mesma eficiência, as moléculas de sal na sua rede proteica.

Portanto, foi possível realizar a adição dos bioativos na nanoestrutura e, então, adicioná-la ao queijo minas frescal, sem trazer alterações significativas para as propriedades físico-químicas, sendo um ponto favorável a aceitação pelo consumidor deste produto funcionalmente melhorado.

A Tabela 24 apresenta a firmeza lateral e superior dos queijos produzidos com encapsulados de quercetina; vitamina B2 e dos queijos controle – isentos de bioativos.

Tabela 24. Perfil médio de textura instrumental a partir da análise de firmeza lateral e superior (N) dos queijos com nanoencapsulados de quercetina; de vitamina B_2 e controle – isento de bioativo

Ensaio	Firmeza Lateral (N)	Firmeza Superior (N)
Quercetina	$2,30 \pm 0,20^{a,b}$	$2,77 \pm 0,15^{b}$
Vitamina B_2	$2,10 \pm 0,17^{a}$	$2,32 \pm 0,17^{a}$
Controle	$2,68 \pm 0,08^{b}$	$3,21 \pm 0,15^{c}$

[a-b-c] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey para a variável resposta Firmeza Superior e variável resposta Firmeza Lateral.

O ensaio com a presença da quercetina é igual estatisticamente ao controle para a firmeza lateral, que se difere da vitamina B_2. Já em relação à firmeza vertical, os ensaios são diferentes estatisticamente. A diferença pode ter se dado pela alteração das interações da nanoestrutura na interface líquido-ar do queijo, o que alterou o processo de gelificação e, consequentemente, de firmeza do produto (MISHRA; MANN; JOSHI, 2001).

A Tabela 25 apresenta a TPA dos queijos produzidos com encapsulados de quercetina; vitamina B2 e dos queijos controle – isentos de bioativos.

Tabela 25. Análise Instrumental de Textura dos queijos com nanoencapsulados de quercetina; de vitamina B_2 e controle – isento de bioativo, em função das variáveis de resposta Coesividade, Adesividade (g.s), Elasticidade, Mastigabilidade (N), Dureza (N)

Ensaio	Coesividade	Adesividade (g.s)	Elasticidade	Mastigabilidade (N)	Dureza (N)
Quercetina	$0,58 \pm 0,10^{a}$	$-8,09 \pm 4,08^{a}$	$0,81 \pm 0,03^{a}$	$31,44 \pm 3,26^{a,b}$	$67,50 \pm 3,21^{a}$
Vitamina B_2	$0,60 \pm 0,01^{a}$	$-16,17 \pm 13,83^{a}$	$0,79 \pm 0,02^{a}$	$33,07 \pm 1,84^{a}$	$69,27 \pm 4,64^{a}$

Controle	0,78 ± 0,05[b]	-2,17 ± 0,09[a]	0,81 ± 0,00[a]	39,86 ± 4,45[b]	72,27 ± 4,86[a]

[a-b] Diferentes sobrescritos diferem significativamente a $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Tukey para a variável resposta.

Ao inserir o bioativo na nanoestrutura de β-lg e aplicá-la no processo produtivo do queijo minas frescal, não houve alterações significativas, pelo teste Tukey, em suas propriedades mecânicas, quando comparado ao controle, contendo somente a nanoestrutura. A diferença estatística ocorreu no parâmetro de coesividade. O encapsulado pode ter alterado a interação da nanoestrutura com a rede proteica do leite, conseguindo manter os níveis de cálcio na massa do queijo, diminuindo a proteólise e mantendo os valores mais elevados de coesividade.

No geral, este fato indica que, mesmo com a adição de bioativo na nanoestrutura, os ensaios mantiveram uma homogeneidade de firmeza e textura, sendo um ponto positivo, uma vez que alterações drásticas poderiam levar a não aceitação pelo consumidor, visto que são medidas diretamente relacionadas ao sensorial e à qualidade final do produto.

Portanto, foi possível realizar a adição da nanoestrutura com bioativos na matriz do queijo, sem trazer alterações significativas para as propriedades físico-químicas e de textura, sendo um forte ponto de inovação, visto que não há, até este momento, na literatura, estudos de melhoria funcional deste alimento, aplicando a nanoestrutura de β-lg com bioativo. Além disso, se mostra uma alternativa viável de aplicação, visto que os queijos com bioativos mantiveram valores reduzidos de condutividade e de ácido lático; pH e sólidos solúveis dentro do esperado e textura firme.

6. CONCLUSÕES

Foi possível obter a nanoestrutura de β-lactoglobulina com tamanho médio de 109,95 nm ao submetê-la ao método de aquecimento por 60 min a 100ºC em 50 $mmol \cdot L^{-1}$ de NaCl. Esta nanoestrutura foi estável por 60 dias ao ser armazenada a 4°C, apresentou melhores incrementos de volume de espuma e maior estabilidade de espuma e emulsão que a proteína em sua forma nativa e foi eficiente na encapsulação de quercetina (96,5%) e vitamina B2 (36,39%). Somado a isso, foi possível produzir, pela primeira vez na literatura até o presente momento, o queijo minas frescal com 2,5% de sal, sendo 50% NaCl e 50% KCl e 7,5 $mg \cdot kg^{-1}$

de nanoestrutura de β-lg sem alterar as propriedades físico-químicas e de textura do queijo, apresentando um produto com melhorias funcionais para a saúde do consumidor, visto que apresenta menores teores de sódio e foram aplicadas nanoestruturas contendo quercetina ou vitamina B_2 encapsuladas. Portanto, a tecnologia proposta por esse trabalho se apresenta, pelos resultados obtidos até aqui, como um potencial promissor de aplicação da nanoestrutura de β-lg na indústria de alimentos, especialmente, laticínios e produção de queijo, no que tange a melhoria da textura e funcionalidade do alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: A review. *International Journal of Dairy Technology*, v. 65 (1), p. 13-21, 2012.

ALVARENGA, N. Introdução da Tecnologia de Congelação na Produção de Queijo de Ovelha. *Tese de Doutorado*. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa. 2008.

ALVARENGA, N.; SILVA, P.; GARCIA, J.R.; SOUSA, I. Estimation of Serpa cheese ripening time using multiple linear regression (MLR) considering rheological, physical and chemical data. *Journal of Dairy Research*. Vol. 75: 233–239, 2008.

ALVES, J. G. L. F.; BRENNEISEN, J.; NINNI, L.; MEIRELLES, A. J. A.; MAURER, G. Aqueous Two-Phase Systems of Poly(ethylene glycol) and Sodium Citrate: Experimental Results and Modeling. *Journal of Chemical & Engineering*, v. 53 (7), p. 1587-1594, 2008.

ANTUNES, A. J. Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino. São Paulo: *Editora Manole*, p.22, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico**, n.69 de 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+69+de+2015/85d1d8f0-5761-4195-9aee-e992abd29b3e>. Acessado em: 12 de outubro de 2018.

AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, L. Encapsulation of bioactive. *In Food Material Science*, Ed. New York, p. 577-601, 2007.

AYYASH, M.M.; SHAH, N.P. Effect of Partial Substitution of NaCl with KCl on Halloumi Cheese during Storage: Chemical Composition, Lactic Bacterial Count, and Organic Acids Production. *Journal of Food Science*. Vol. 75 (6): 525-529, 2010.

AZEVEDO, M. A.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; CERQUEIRA, M. A. Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 71, p. 141–146, 2014.

BAILEY J.K.; MECARTNEY, M. L. Formation of colloidal silica particles from alkoxides. *Colloids and Surfaces*. V. 63(1), p. 151-61, 1992.

BALD, A.; KINART, Z.; WYPYCH-STASIEWICZ, A.; TOMAŠ, R. Conductance studies of NaCl, KCl, NaBr, KBr, Bu4NBr, and NaBPh4 in water + 2-methoxyethanol mixtures at 298.15K. *Journal of Molecular Liquids*, v. 182, p. 14–24, 2013.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHU, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição*, v. 15, n.3, p. 285-292, 2004.

BORGES, J.; DE SOUZA, J.; FAGNANI, R.; NOBRE COSTA, G.; SIFUENTES DOS SANTOS, J. Reduced-fat Frescal sheep milk cheese with inulin: A first report about

technological aspects and sensory evaluation. *Journal of Dairy Research*, 86(3), 368-373, 2019.

BRANDELLI, A.; BRUM, L. F. W.; DOS SANTOS, J. H. Z. Nanostructured bioactive compounds for ecological food packaging. *Environmental Chemistry Letters*, v. 15, n. 2, p. 193-204, 2017.

BRASIL, Leis, decretos, etc. *Instrução Normativa no 4/2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Inclui o termo "Muito" na expressão "Alto Umidade" nos itens 2.2 (Classificação), 4.2.3 (Requisitos Físico-Químicos) e 5.1 (Aditivos), no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas frescal.

BUENO COSTA, R. G.; JUNIOR, A. C.; CRUZ, A. G.; SOBRAL, D.; JÚNIOR, L. C. G. C; PAULA, J. C. J.; MOREIRA, G. M. M.; TEODORO, V. A. M. Effect of partial replacement of sodium chloride with potassium chloride on the characteristics of Minas Padrão cheese. *International Dairy Journal*, v. 91, p. 48-54, 2019.

BUENO COSTA, R. G.; ALVES, R. C.; DA CRUZ, A. G; SOBRAL, D.; TEODORO, V. A. M.; COSTA JUNIOR, L. C. G.; DE PAULA, J. C. J.; LANDIN, T. B.; MIGUEL, E. M. Manufacture of reduced-sodium Coalho cheese by partial replacement of NaCl with KCl, *International Dairy Journal*, Volume 87, Pages 37-43, 2018.

CAMERON, D. R.; WEBER, M.E.; IDZIAK, E.S.; NEUFELD, R.J.; COOPER, D.G. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index. Journal of Agricultural and *Food Chemistry*, Washington, v.39, n.4, p.655-659, Apr. 1991.

CARVALHO, J. D. G; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological process. *Food Control*, v. 18, p. 262-267, 2007.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASSTLE, A.; AITKEN, R.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants*, v. 25(3), p. 241–258, 2008.

CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERSB, G.; ROUPASB, P.; BRODKORBC, A. Bioactivity of b-lactoglobulin and a-lactalbumin—technological implications for processing. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1229–1240, 2006.

CHAVHAN, G.B.; KANAWJIA, S.K.; KHETRA, Y.; PURI, R. Effect of potassiumbased emulsifying salts on sensory, textural, and functional attributes of low-sodium processed Mozzarella cheese. *Dairy Science and Technology*, v. 95, p. 265-278, 2015.

CHAVOSHPOUR-NATANZIA, Z.; SAHIHIB, M. Encapsulation of quercetin-loaded β-lactoglobulin for drug delivery using modified anti-solvent method. Food Hydrocolloids, v. 96, p. 493–502, 2019.

CHELLARAMA, C.; MURUGABOOPATHIB, G.; JOHNA, A. A.; SIVAKUMARC, R.; GANESAND, S.; KRITHIKAE, S.; PRIYA, G. Significance of Nanotechnology in Food Industry. *APCBEE Procedia*, v. 8, p. 109 – 113, 2014.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17 (5), p. 272-283, 2006.

CHEN, H.; WEISS, J.; SHAHIDI, F., Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technology*, v. 60 (3), p. 30-36, 2006.

CHEN, L.; SUBIRADI, M. Chitosan/β-lactoglobulin core–shell nanoparticles as nutraceutical carriers. *Biomaterials*, v. 26, p. 6041–6053, 2006.

CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO- SANT'ANA, H. M. Effects of industrial foods processing on vitamins stability. *Alim. Nutr*., v.19, n.1, p. 83-95, 2008.

COSTA, R. N. Nanoestruturas de β-lactoglobulina e sua capacidade de encapsular moléculas bioativas. *Trabalho de Conclusão de Curso*. Graduação em Engenharia de Bioprocessos. Universidade Federal de São João del-Rei, 2016.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; POLLONIO, M. A. R.; BOLINI, H. M. A.; CELEGHINI, R. M. S.; granato, D. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. *Trends in Food Science and Technology*, v. 22, p. 276–291, 2011.

CUNHA, Clarissa Reschke da *et al*. Efeito do fator de concentração do retentado na composição e proteólise de queijo minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. *Ciênc. Tecnol. Aliment*., Campinas, v. 22, n. 1, p. 82-87, jan. 2002

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, v.106, p. 256-271, 2015.

DE PAULA, Junio César Jacinto; DE CARVALHO, Antônio Fernandes; FURTADO, Mauro Mansur. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009.

DIAMANTINO, V. R. Efeito da adição de amido de milho ceroso em queijo Minas frescal com teor reduzido de gordura. 2013. 91 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2013.

DIARRASSOUBA, F.; GARRAIT, G.; REMONDETTO, G.; ALVAREZ, P.; BEYSSAC, E.; SUBIRADE, M. Improved bioavailability of vitamin D3 using a β-lactoglobulin-based coagulum. *Food Chem*, v. 172, p. 361-367, 2015.

DIAS, B. F.; FERREIRA, S. M.; CARVALHO, V. S.; SOARES, D. S. B. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. *Revista de Agricultura Neotropical*, v. 3, n. 3, p. 57-64, 2016.

DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and theology. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*,197-210, 2001.

DOYLE, M. E.; GLASS, K. A. Reduction and its effect on food safety, food quality, and 389 human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 9, p. 44–56, 2010.

DUDEJA, P.; GUPTA, R. K. Nutraceuticals. *Food Safety in the 21st Century*, ch. 40, p. 491-496, 2017.

DUFOUR, E.; ROBERT, P.; RENARD, D.; LLAMAS, G. Investigation of b-lactoglobulin gelation in water/ethanol solutions. *International Dairy Journal*, v. 8(2), p. 87–93, 1998.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Empraba). *Panorama do Leite*. Ano 7, n.65, Outubro de 2015.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Empraba). *Anuário do Leite*. Agosto, 2018

FANG, X. et al. Commercial cheeses with different texture have different disintegration and protein/peptide release rates during simulated in vitro digestion. *International Dairy Journal*, n.56, 2016, p.169 - 178.

FELICIO, T. L.; ESMERINO, E. A.; VIDAL, V. A. S.; CAPPATO, L. P.; GARCIA, R. K. A; CAVALCANTI, R. N.; FREITAS, M. Q.; CONTE JUNIOR, C. A.; PADILHA, M. C.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L; ARELLANO, D.B; BOLLINI, H. M. A.; POLLONIO, M. A. R; CRUZ, A. G. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, v. 196, p. 628-637, 2016.

FELICIO, T. L.; ESMERINO, E. A.; CRUZ, A. G.; NOGUEIRA, L. C.; RAICES, R. S. L.; DELIZA, R.; BOLINI, H. M. A.; POLLONIO, M. A. R. Cheese. What is its contribution to the sodium intake of Brazilians? *Appetite*, 2013.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema. (4. Ed.). Artmed, 2010.

FERRÃO, L. L.; SILVA, E.B.; SILVA, H. L. A.; SILVA, R.; MOLLAKHALILI, N.; GRANATO, D.; FREITAS, M. Q.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; PADILHA, M. C.; ZACARCHENCO, P. B., BARBOSA, M. I. M. J.; MORTAZAVIAN, A. M.; CRUZ, A. G. Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. *Food Research International*, v. 86, p. 93-102, 2016.

FIDELIS, P. C. Desenvolvimento de um adsorvente contínuo supermacroporoso de troca catiônica para recuperação de lactoferrina de soro de leite. *Dissertação (Mestrado*). Universidade Federal de Viçosa, 2011.

FORREST, S.A., YADA, R.Y., ROUSSEAU, D. Interactions of vitamin D3 with bovine b-lactoglobulin and b-casein. J. Agric. *Food Chem*, v. 53, p. 8003–8009, 2005.

FOULADKHAH, A.; BERLIN, D. High-Sodium Processed Foods: Public Health Burden and Sodium Reduction Strategies for Industry Practitioners. *Food Reviews International*, v. 31(4), p. 341-354, 2015.

FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H. Advanced dairy chemistry in proteins. *Adv. Dairy Chem.*, v. 1, 2003.

GIBBS, F.; INTEAZ ALLI, S. K.; CATHERINE, N.; MULLIGAN, B. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 50 (3), p. 213-224, 1999.

GHALANDARI, B.; MONAJJEMI, M.; MOLLAAMIN, F. Theoretical Investigation of Carbon Nanotube Binding to DNA in View of Drug Delivery. *J. Comput*., v. 8, p. 1212–1219, 2011.

GUINEE, T.P.; FOX, P.F. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, v. 1, p. 207-259, 2004.

GOMES, A. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; CELEGHINI, R. M. S.; FARIA, J. A. F; BOLINI, H. M. A.; POLLONIO, M. A. R.; GRANATO, D. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. *Journal of Dairy Science*, v. 94 No. 6, p. 2701-2706, 2011.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. Cheese Rheology and Texture. Washington: CRC Press, 2003.

GUPTA, J. Nanotechnology applications in medicine and dentistry. *JICD*, v. 2, p. 81–88, 2011.

GUPTA, S.; CHAUHAN, D.; MEHLA, K.; SOOD, P.; NAIR, A. An overview of nutraceuticals: current scenario. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy,* v. 1 (2), p. 55-62, 2010.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology,* v. *45* (11), p. 2179-2205, 2007.

HOFFMANN, W.; GÄRTNER J.; LÜCK, K.; JOHANNSEN, N.; MAURER, A. Effect of emulsifying salts containing potassium on the quality of block-type processed cheese. *International Dairy Journal*, 25, 66-72, 2012.

HOLT, C. Molecular basis of whey protein food functionalities. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 55(2), p. 53–55, 2000.

HO-KYUNG, H.; JIN WOOK, K.; MEE-RYUNG, L.; WON-JAE, L. Formation and characterization of quercetin-loaded chitosan oligosaccharide/β-lactoglobulin nanoparticle. *Food Research International*, v. 52, p. 82–90, 2013.

HU C. M. J.; ARYAL, S.; ZHANG, L. Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Ther Deliv*, v. 1, p. 323–334, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos* (4.ed.). São Paulo: IAL, 2008.

Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor - IDEC. *Redução de sódio em alimentos: uma análise dos acordos voluntários no Brasil*, 2014.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1ª ed., v. 81, p. 1 -30, 2017.

JONES, O. G.; LESMES, U.; DUBIN, P.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of βlactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocoll*, v. 24, p. 374-383, 2010.

KAMLEH, R.; OLABI, A.; TOUFEILI, I.; NAJM, N.E.O; YOUNIS, T.; AJIB, R. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*. Vol. 95: 1140-1151, 2012.

KATSIARI, M.C.; ALICHANIDIS, E.; VOUTSINAS, L.P.; ROUSSIS, I.G. Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 635-646, 2000.

KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. & ROUSSIS, I.G. Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*. Vol. 61 (1/2): 63- 70, 1998.

KATSIARI, M.C.; VOUTSINAS; L.P.; ALICHANIDIS, E.; ROUSSIS, I.G. Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal.* Vol. 7: 465-472, 1997.

KIKUCHI, M. efeito do tratamento térmico do leite e retentado na qualidade de queijo minas frescal light fabricado por ultrafiltração. 2008. 95 f. Dissertação (mestrado). Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

KOLAKOWSKI, P.; DUMAY, E.; CHEFTEL, J. C. Effects of high pressure and low temperature on β-lactoglobulin unfolding and aggregation. *Food Hydrocolloids, 15*(3), 215-232, 2001.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; PAKADE, Y. B.; SINGH, B.; YADAV, S. C. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 80(2), p. 184 – 192, 2010.

LEMAN, J.; DOGA, T. Effect of temperatura and high pressure on the foaming properties of beta-lactoglobulin salted out at pH 2. *Commun Agric Appl Biol Sci*, v. 68, n. 2, pt. B, p. 489-492, 2003.

LI, H.; WANG, D.; LIU, C.; ZHU, J.; FAN, M.; SUN, X.; CAO, Y. Fabrication of stable zein nanoparticles coated with soluble soybean polysaccharide for encapsulation of quercetin. *Food Hydrocolloids*, v. 87, p. 342–351, 2019.

LI, H.; ZHAO, X.; MA, Y.; ZHAI, G.; LI, L.; LOU, H. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release, v. 133* (3), p. 238-244, 2009.

LIANG, L.; TAJMIR-RIAHI, H. A.; SUBIRADE, M. Interaction of β-Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules*, v. 9, p. 50-56, 2008.

LINDSAY, R.C., HARGETT, S.M., BUSH, C.S. Effect of sodium/potassium (1:1) chloride and low sodium chloride concentrations on quality of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 360-370, 1982.

LIVNEY, Y. D. Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. *Current Opinion in Food Science*, v. 3, p. 125-135, 2015.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 15 (1–2), p. 73-83, 2010.

LOVEDAY, S. M.; SAWYER. L. β-Lactoglobulin: Nomenclature, Structure, and Function. *Reference Module in Food Science*, 2016.

MACK, M.; GRILL, S. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 71 (3), p. 265-275, 2006.

MADALENA, D. A.; RAMOS, O. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; XAVIER MALCATA, F.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. In vitro digestion and stability assessment of β-lactoglobulin/riboflavin nanostructures. *Food Hydrocolloids*, Portugal, v. 58, p. 89-97, 2016.

MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. User Manuals, England, 2009. Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/zetasizer_nanozs_manual.pdf >. Acesso em: 19/07/2020.

MARINHO, H. A.; DE SOUZA, D. C. Comparação da avaliação sensorial de dois tipos de queijo pettit suisse sabor de cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum) elaborados com queijo minas e com queijo ricota, 2009.

MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. *Altern Med Rev*, v. 9, p. 136- 156, 2004.

MAURIZIO, A. J.; VLIEGER, J.D; ERRICO, M.E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; VOLPE, M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, v. 93, p. 467–474, 2005.

MELO FILHO, Artur Bibiano de; VASCONCELOS, Margarida Angélica da Silva. Conservação de Alimentos. 2016.

Ministério da Saúde, [2012]. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_promocao_da_saude.php?conteudo=reducao>. Acessado em: 12 de outubro de 2018.

MIRPOOR, S.F.; HOSSEINI; S.M.H., NEKOEI, A-R. Efficient delivery of quercetin after binding to beta-lactoglobulin followed by formation soft-condensed core-shell nanostructures. *Food Chemistry*, v. 233, p. 282-289, 2017.

MISHRA, S.; MANN, B.; JOSHI, V. K. Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids, v. 15* (1), p. 9-15, 2001.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. *Food Industry*, c. 24, 2013.

MOREIRA, G. M. M. Queijos Gorgonzola, Prato, Parmesão e Mussarela: influência do tempo de maturação no perfil de aminas bioativas, aminoácidos livres, textura e características físico-químicas e microbiológicas. 2018. 172 f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Belo Horizonte, 2018.

NAGYOVÁ, G.; BUŇKA, F.; SALEK, R.N.; CERNÍKOVÁ, M.; MANCÍK, P.; GRÛBER, T.; KUCHAR, D. Use of Sodium Polyphosphates with Different Linear Lengths in the Production of Spreadable Processed Cheese. *Journal of Dairy Science*, 97, 111- 122, 2014.

NATARAJAN, V.; KRITHICA, N.; MADHAN, B.; SEHGAL, P. K. Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 100* (1), p. 195-205, 2011.

NETO, R. J. Avaliação tecnológica e físico-química de queijo tipo minas frescal obtido a partir do leite concentrado por ultrafiltração. 2006. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

NOHR, D.; BIESALSKI, H. K.; BACK, E. I. Riboflavin. *Vitamins*, v.4, p. 2694–2699, 2002.

OKAGUA, O. D.; WANG, B.; ACQUAHC, C.;UDENIGWEA, C. C. Protein-Based Nanodelivery Systems for Food Applications. *Encyclopedia of food chemistry*, p. 719-726, 2019.

OLIVEIRA, E.W.; ESMERINO, E.A.; CARR, B.T.; PINTO, L.P.F.; SILVA, H.L.A.; PIMENTEL, T.C.; BOLINI, H.M.A.; CRUZ, A.G.; FREITAS, M.Q. Reformulating Minas Frescal cheese using consumers' perceptions: Insights from intensity scales and check-all-that-apply questionnaires. *Journal of Dairy Science*, Vol. 100, p. 6111-6124, 2017.

Organização Mundial da Saúde - OMS. Review and updating of current WHO recommendations on salt/sodium and potassium consumption. Geneva, Switzerland, 2011.

PATEL, R. V.; MISTRY, B. M; SHINDE, S. K.; SYED, R.;SINGH, V.; SHIN, H. S. Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 155, p. 889-904, 2018.

PATHAK, Y.; THASSU, D. Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, First Edition, 2009.

PELEGRINE, D. H. G. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Brazilian Journal of Food Technology*. VII BMCFB, 2008.

PEREIRA, I. O. Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico. 2009. *Dissertação* (Pós Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Pro-Reitoria de pesquisa e Pós-Gradução em Engenharia de Alimentos. Itapetinga, BA, Brasil. 2009.

PEREIRA, R. N.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Effects of Electric Fields on Protein Unfolding and Aggregation: Influence on Edible Films Formation. *Biomacromolecules, 11*(11), 2912-2918, 2010.

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; DA SILVA, R. S. S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 77-85, 2010.

PIERETTI, G. G.; PINHEIRO, M. P.; SCAPIM, M. R. S.; MIKCHA, J. M. G.; MADRONA, G. S. Effect of an edible alginate coating with essential oil to improve the quality of a Fresh cheese. *Science, Food Technology and Food Engineering*, v. 41, p. 2-8, 2019.

POWERS, J. H. Vitamin B2. *Am. J. Nutr*, v. 77, p. 1352, 2003.

PRAZERES, A. R.; F. CARVALHO, J. R. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 110, p. 48-68, 2012.

QUEIROGA, R. C. R. E.; SANTOS, B. M.; GOMES, A. M. P.; MONTEIRO, M. J.; TEIXEIRA, S. M.; SOUZA, E. L.; PEREIRA, C. J. D.; PINTADO, M. M. E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goat's, cow's milk and their mixture. *Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 538- 544, 2013.

RAJAT, S.; MANISHA, S.; ROBIN, S.; SUNIL, K. Nutraceuticals: a review. *International Research Journal of Pharmacy*, v. 3 (4), p. 5, 2012.

REEVE, B.; MAGNUSSON, R. Food reformulation and the (neo)-liberal state: new strategies for strengthening voluntary salt reduction programs in the UK and USA. *Public Health*, v. 129, p. 351-363, 2015.

RUSZNYAK, S.; SZENT-GYORGYI, A. Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*, v. 138, p. 27–29, 1936.

SAHIHI, M.; HEIDARI-KOHOLI, Z.; BORDBAR, A. K. The interaction of polyphenol flavonoids with β-lactoglobulin: molecular docking and molecular dynamics simulation studies. *Journal of Macromolecular Science*, Part B, v. 51(12), p. 2311-2323, 2012.

SANGALETTI, Naiane et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 29, n. 2, 2009.

SANTOS, I. J. B.; HERNANDEZ, H. L. H.; COSTA, M. H. C.; JÚNIOR, J. A. d. Q. L.; DOS REIS COIMBRA, J. S. Conjugates of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and lysozyme

with polysaccharides: Characterization and techno-functional properties. *Food Research International, v. 116*, p. 492-498, 2019.

SANTOS, T. J.; PIERETTI, G. G.; MARQUES, D. R.; SCAPIM, M. R. S.; BRANCO, I. G.; MADRONA, G. S. Microbial, physical, chemical and sensory properties of Minas Frescal Cheese with Inulin and gum Acacia. *Science, Food Technology and Food Engineering*, v. 37, n. 1, p. 155-160, 2015.

SIMÕES, L. S.; ABRUNHOSA, L.; VICENTE, A.; RAMOS, O.L. Suitability of β-lactoglobulin micro- and nanostructures for loading and release of bioactive compounds, *Food Hydrocolloids*, novembro de 2019.

SCRINIS, G.; LYONS, K. The emerging nano-corporate paradigm: Nanotech-nology and the transformation of nature, food and agri-food systems. *International Journal of Sociology of Agriculture and Food*, v. 15 (2), p. 22-44, 2007.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.8, n.1, p. 43-56, 2005.

SHAFAEI, Z.; GHALANDARI, B.; VASEGHI, A.; DIVSALAR, A.; HAERTLE, T.; SABOURY, A. A.; SAWYE, L. β-lactoglobulin: an efficient nanocarrier for advanced delivery system. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 13, p. 1685-1692, 2017.

SHOJI, Y.; NAKASHIMA, H. Nutraceutics and Delivery Systems. *Journal of Drug Targeting***,** v. 12 (6), p. 385-391, 2004

SILVA, F. T. Queijo minas frescal. *Embrapa Informação Tecnológica*, 2005.

SINGH, M.; MANIKANDAN, S.; KUMARAGURU, A. K. Nanoparticles: A New Technology with Wide Applications. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 1, p. 11, 2011.

SOARES, C. P. Influência da redução de sal nas propriedades do queijo de São João da Ilha do Pico. *Tese de Doutorado*. Faculdade de Ciência e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa. 2013.

SOUZA, A. M. Impacto da redução do teor de sódio em alimentos processados no consumo de sódio no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 32, 2016.

SOUZA, T. G. F.; CIMINELLI, V. S. T.; MOHALLEM, N. D. S. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series, 733*, 2016.

TAORMINA, P. J. Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, p. 209-227, 2010.

TANIGUCHI, N. On the basic concept of ‘nano-technology’. *Proc Intl Conf Prod Eng Tokyo*, Part II, JSPE, p. 5–10, 1974.

TARHINI, M.; GREIGE-GERGES, H.; ELAISSARI, A. Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 522, p. 172-197, 2017.

TAVARES, G. M.; CROGUENNEC, T.; CARVALHO, A. F.; BOUHALLAB, S. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. *Trends in Food Science & Technology*, v. 37 (1), p. 5-20, 2014.

TELESSY, I. G. Nutraceuticals. *The Role of Functional Food Security In Global Health*, ch. 24, p. 409-421, 2019.

TOBLER, D.J.; SHAW, S.; BENNING, L.G. Quantification of initial steps of nucleation and growth of silica nanoparticles: An in-situ SAXS and DLS study. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. V. 73(18), p. 5377-93, 2009.

USKOKOVIĆ, V. Nanotechnologies: What we do not know. *Technology in Society*, v. 29, n. 1, p. 43-61, 2007.

VITOLA, H. R.S.; GRÜTZMANN, L. S.CUNHA, C.; TUCHTENHAGEN, V.; RODRIGUES, R. da S.; GALVÃO, M. R. G. Desenvolvimento e caracterização físicoquímica de queijo petit-suisse com batata-doce. *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2016.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. *Dairy Science and Technology*. 2 ed. New York: CRC Press, 2006.

WANG, G., ULUDAG, H. Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targeting systems with emphasis on protein-based nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv*, v. 5, p. 499-515, 2008.

WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int. J. Pharm*, v. 194, p. 91–102, 2000.

WOOSTER, T. J.; AUGUSTIN, M. A. Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1072–1080, 2007.

WYATT, C.J. Acceptability of reduced sodium in breads, Cottage cheese, and pickles. *Journal of Food Science*, v. 48, p. 1300-1302, 1983.

YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, v. 32, p. 173-187, 2011.

ZAGURY, Y.; KAZIR, M.; LIVNEY, Y. D. Improved antioxidant activity, bioaccessibility and bioavailability of EGCG by delivery in β-lactoglobulin particles. *Journal of Functional Foods*, v. 52, p. 121–130, 2019.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its 708 nanocomplexes with pectin as vehicles for ω-3 polyunsaturated 709 fatty acids. *Food Hydrocolloids*, v. 23(4), p. 1120-1126, 2009.

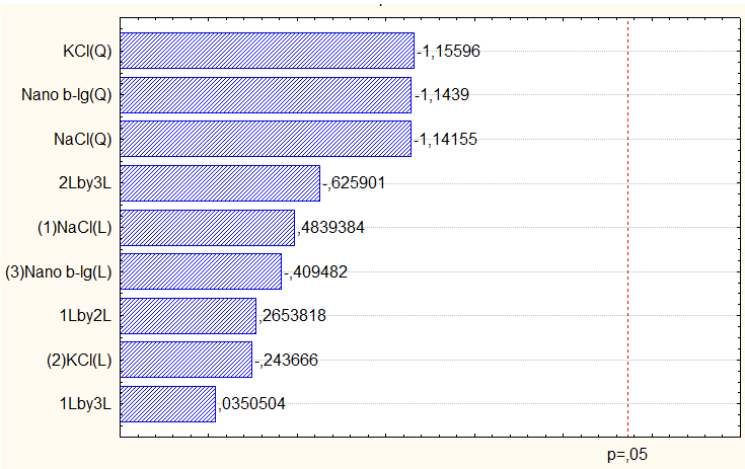
ZHANG, J.; LIU, X.; SUBIRADE, M.; ZHOU, P.; LIANG, L. A study of multi-ligand betalactoglobulin complex formation. *Food Chem*, v. 165, p. 256-261, 2014.

ZIMET, P.; LIVNEY, Y.D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocoll*. V. 23, p. 1120–1126, 2009.

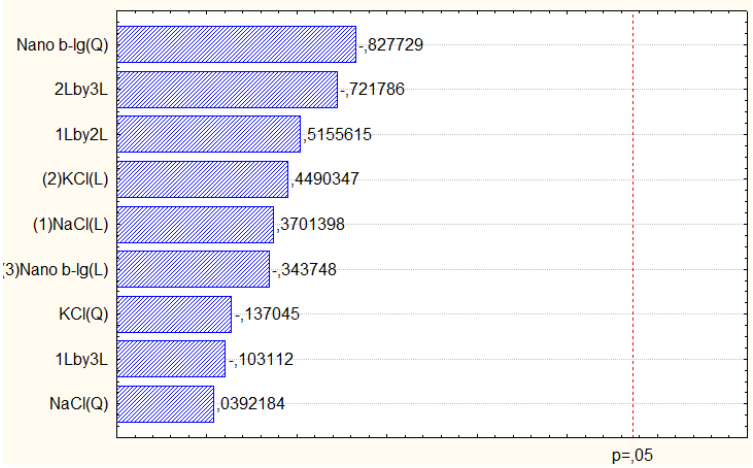
ZOU, L.; ZHENG, B.; ZHANG, R.; ZHANG, Z.; LIU, W.; LIU, C.; MCCLEMENTS, D. J. Food grade nanoparticles for encapsulation, protection and delivery of curcumin: comparison of lipid, protein, and phospholipid nanoparticles under simulated gastrointestinal conditions. *RSC Advances*, v. 6(4), p. 3126–3136, 2016.

APÊNDICE

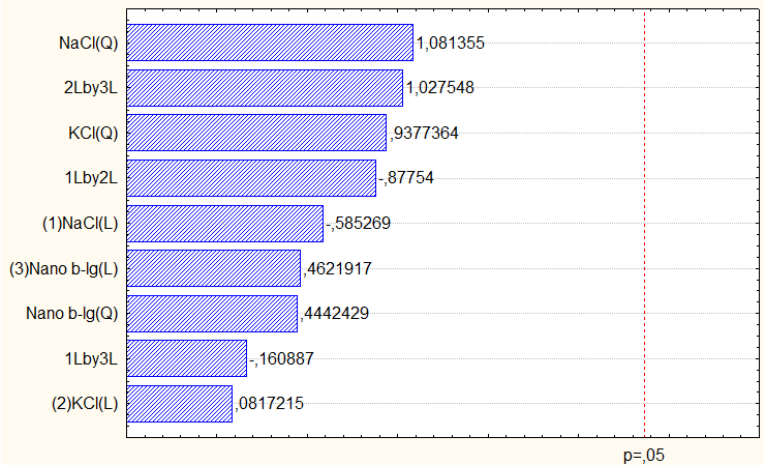
(A) Gráfico de Pareto para pH do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



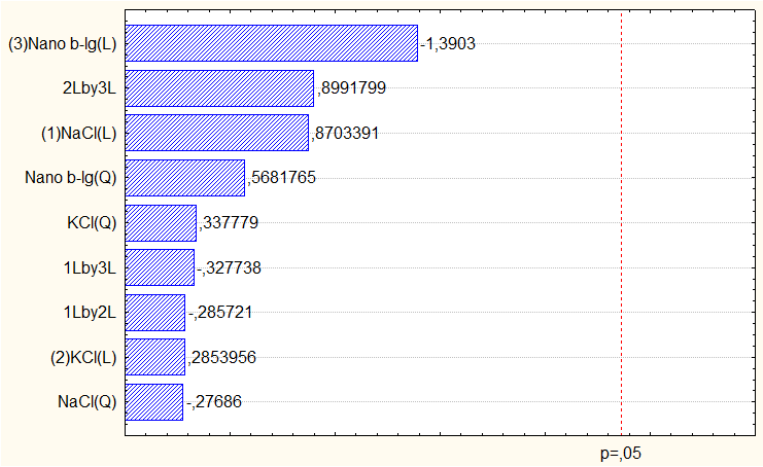
(B) Gráfico de Pareto para Brix do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



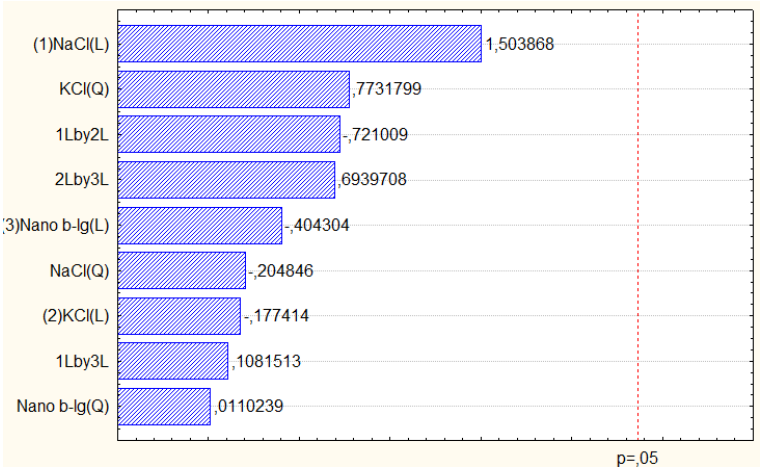
(C) Gráfico de Paretto para Ácidez Titulável do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



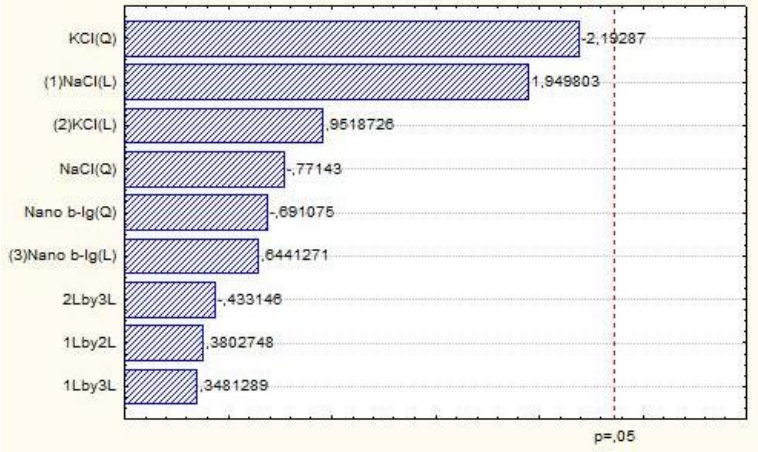
(D) Gráfico de Paretto para Firmeza Superior do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



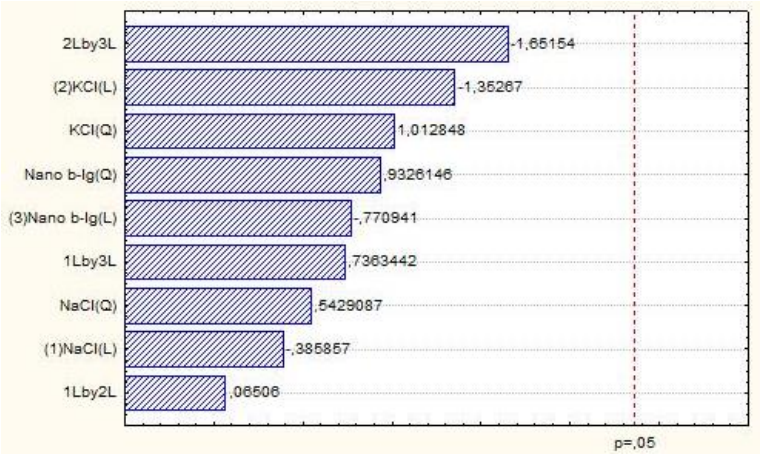
(E) Gráfico de Paretto para Firmeza Lateral do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



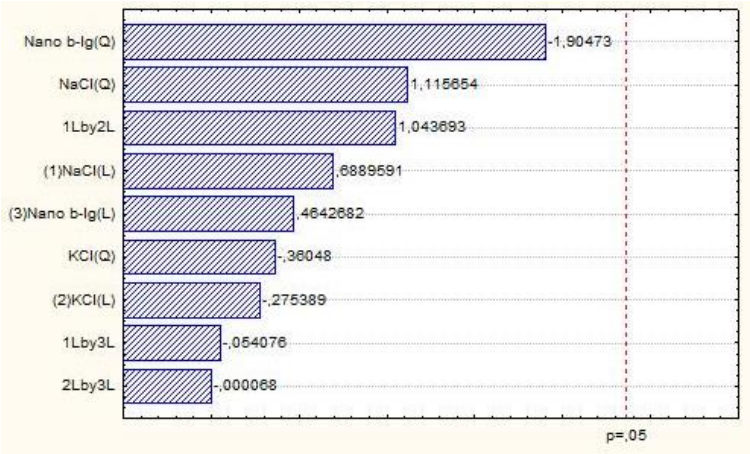
(F) Gráfico de Paretto para Coesividade do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



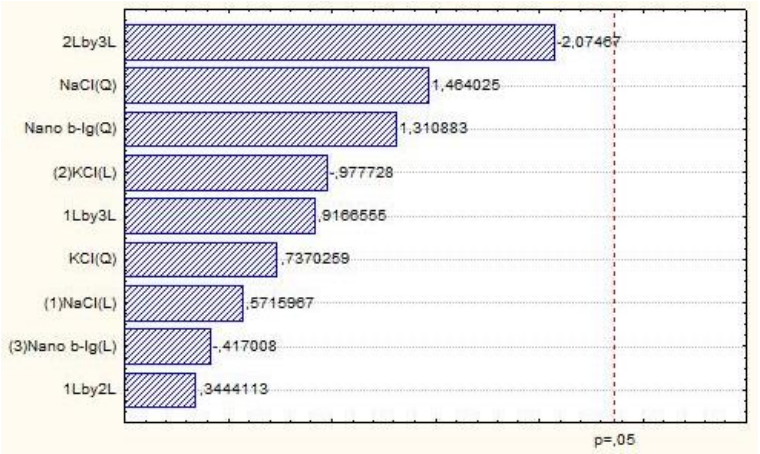
(G) Gráfico de Paretto para Dureza do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



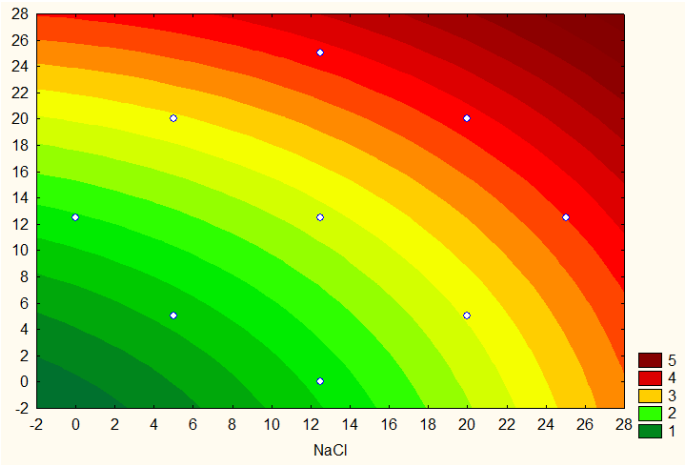
(H) Gráfico de Paretto para Elasticidade do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



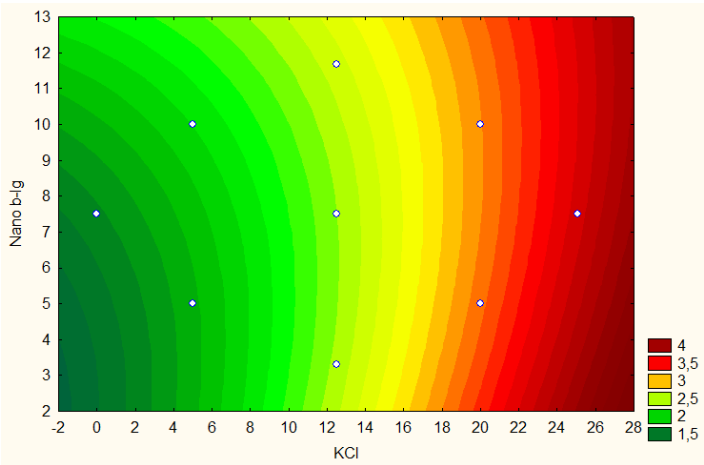
(I) Gráfico de Paretto para Mastigabilidade do DCCR dos queijos com nanoestrutura de β-lg



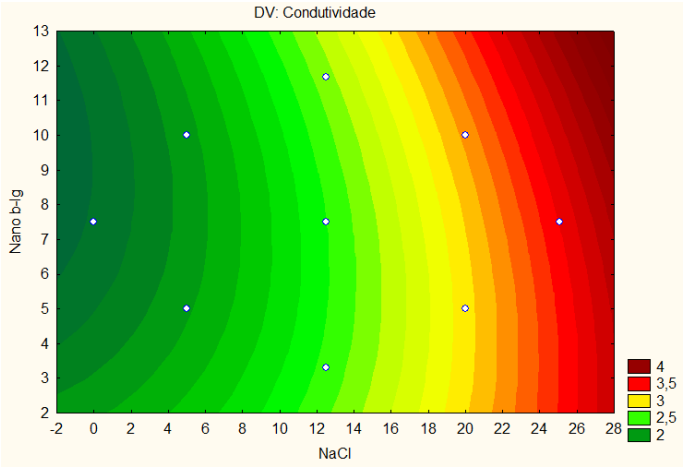
(J) Superfície de resposta 2D do DCCR de três fatores com a variável dependente a condutividade elétrica em função das variáveis codificadas concentração de NaCl e KCl



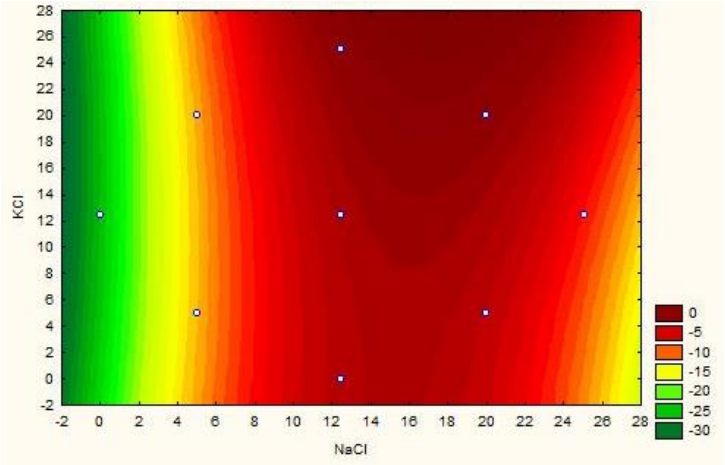
(K) Superfície de resposta 2D do DCCR de três fatores com a variável dependente a condutividade elétrica em função das variáveis codificadas concentração de KCl e nanoestrutura de β-lg



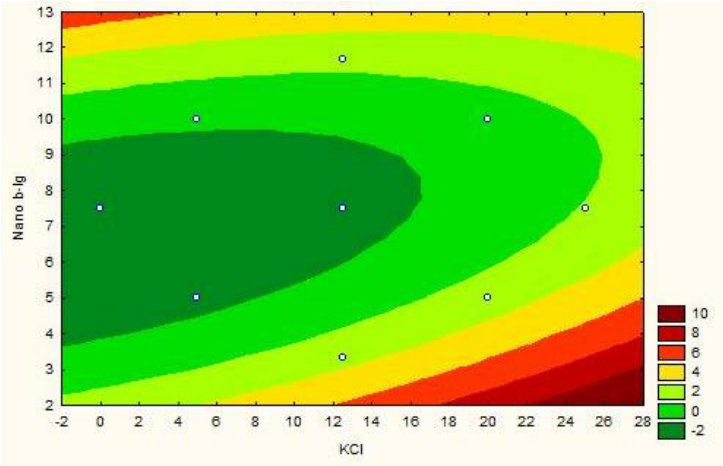
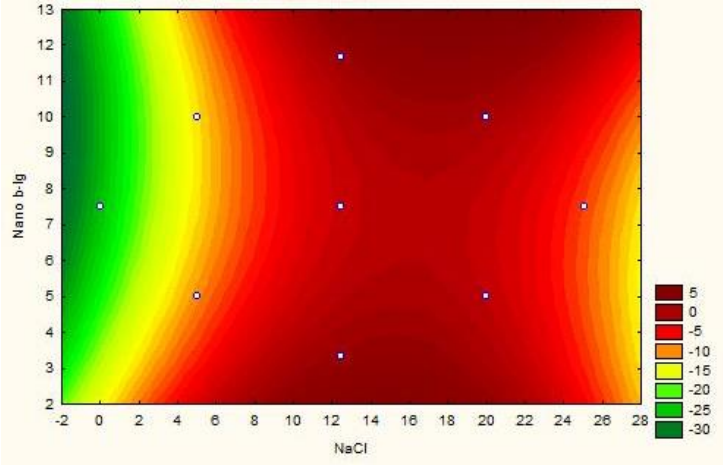
(L) Superfície de resposta 2D do DCCR de três fatores com a variável dependente condutividade elétrica em função das variáveis codificadas concentração de NaCl e nanoestrutura de β-lg



(M) Superfície de resposta 2D do DCCR de três fatores com a variável dependente adesividade em função das variáveis codificadas concentração de NaCl e KCl



(N) Superfície de resposta 2D do DCCR de três fatores com a variável dependente adesividade em função das variáveis codificadas concentração de KCl e nanoestrutura de β-lg



(M) Superfície de resposta 2D do DCCR de três fatores com a variável dependente adesividade em função das variáveis codificadas concentração de concentração de NaCl e da nanoestrutura de β-lg