Universidade Federal de São João del-Rei

Universidade Federal de São João del Rei
campus Alto Paraopeba
Programa de Pós-graduação em Engenharia Química

Jhonatan Rafael de Oliveira Bianchi

Incorporação de alfa-la nanoestruturada em queijo *minas frescal* para a redução de sódio e melhoramento funcional

Incorporation of nanostructured alfa-la in *minas frescal* cheese for sodium reduction and functional improvement

Ouro Branco - MG

2021

Jhonatan Rafael de Oliveira Bianchi

Incorporação de alfa-la nanoestruturada em queijo *minas frescal* para a redução de sódio e melhoramento funcional

Incorporation of nanostructured alfa-la in *minas frescal* cheese for sodium reduction and functional improvement

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São João del-Rei como exigência do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química para a obtenção de título de Mestre em Engenharia Química

*Bolsista UFSJ

Orientador: Prof. Dr. Igor José Boggione Santos

Coorientador(a) interno(a): Prof.ª Dra. Cristiane Medina Finzi Quintão

Coorientador(a) Externo(a): Prof.ª Dra. Jane Selia dos Reis Coimbra

Ouro Branco - MG
2021

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)

B578i

Bianchi, Jhonatan Rafael de Oliveira.
Incorporação de alfa-la nanoestruturada em queijo minas frescal para a redução de sódio e melhoramento funcional./ Jhonatan Rafael de Oliveira Bianchi; orientador Igor José Boggione Santos; coorientador Jane Selia dos Reis Coimbra; coorientador Cristiane Medina Finzi Quintão. -- Ouro Branco, MG, 2021.
107 p. il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São João del-Rei, 2021.

1. Nutracêutico 2. Nanoproteína 3. Soro de leite 4. Planejamento experimental 5. Encapsulamento I. Santos, Igor José Boggione, orient. II. Coimbra, Jane Selia dos Reis, coorient. III. Quintão, Cristiane Medina Finzi, coorient. IV. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA Nº 16 / 2021 - PPGEQ (13.13)

Nº do Protocolo: 23122.027469/2021-48

Ouro Branco-MG, 09 de agosto de 2021.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **JHONATAN RAFAEL DE OLIVEIRA BIANCHI**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI, EM 06 DE AGOSTO DE 2021.

BANCA EXAMINADORA:

"Assinado por concordância com Ata de Defesa realizada por videoconferência"

(E-mail da examinador externo enviado para o PPGEQ)

Prof. Dr. Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior

UFV

"Assinado por concordância com Ata de Defesa realizada por videoconferência"

(E-mail da examinadora externa enviado para o PPGEQ)

Profa. Dra. Jane Sélia dos Reis Coimbra

UFV

(Assinado digitalmente em 09/08/2021 17:21)
CRISTIANE MEDINA FINZI QUINTAO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
GABIN (11.00)
Matrícula: 1861356

(Assinado digitalmente em 09/08/2021 16:56)
EDSON ROMANO NUCCI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQBIO (12.26)
Matrícula: 1811284

(Assinado digitalmente em 10/08/2021 13:11)
IGOR JOSE BOGGIONE SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CEBIO (12.50)
Matrícula: 2255060

Para verificar a autenticidade deste documento entre em **https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp** informando seu número: **16**, ano: **2021**, tipo: **NOMEAÇÃO DE BANCA EXAMINADORA**, data de emissão: **09/08/2021** e o código de verificação: **878578f238**

"Os Filósofos têm apenas interpretado o mundo de maneiras diferentes; a questão, porém, é transformá-lo."

Karl Marx

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela vida e pelas oportunidades.

À minha família, meus pais e avós que sempre me apoiaram nessa jornada acadêmica, serei eternamente grato por tudo.

Aos amigos que são meu suporte nos momentos de alegria e de tristeza sempre juntos para enfrentar as dificuldades dessa etapa. Aqui posso destacar toda a República Bartira, uma verdadeira família; os amigos do CrerSer que me ensinaram muito mais do que a arte; o meu amigo Saymon, juntos desde o início da graduação, agradeço todo o apoio em todos os momentos pessoais e acadêmico.

Ao Grupo de pesquisa Nanotec por toda parceria e amizade nesses anos de pesquisa. Com destaque ao aluno Andersen que trabalhou comigo como aluno de IC me auxiliando em experimentos deste e outros trabalhos.

Por último e não menos importante, agradeço todo o apoio, a orientação e a amizade do meu orientador Prof. Dr. Igor Boggione que apostou em mim para conduzir esse e outros projetos, sendo um tutor na pesquisa e um exemplo de educador.

Muito obrigado a banca por aceitar dar as contribuições a este trabalho.

Agradeço a UFSJ, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e espaço físico sem os quais essa singela pesquisa não seria possível.

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). A equipe da instalação (Microscopia eletrônica) é reconhecida pela assistência durante os experimentos (TEM 25381).

Ao Laboratório multiusuário CiPharma da UFOP pelas análises do DLS no NanoZeta Sizer; ao Prof. Dr. Washington Azevêdo da Silva pelas análises de TPA dos queijos.

Que as páginas aqui descritas cumpram seu papel de uma pequena contribuição a ciência brasileira.

RESUMO

O uso de proteína α-lactoalbumina nanoestruturada pura (nano α-la pura) e com bioativos encapsulados como substituinte parcial do NaCl na produção de queijo minas frescal foi testado nesse trabalho, para produzir um queijo com menor teor de sódio e sem manutenção das propriedades técnico-funcionais dada à necessidade da diminuição do consumo de NaCl que causa danos à saúde humana. O raio hidrodinâmico da nano α-la pura obtida foi de 191,10 ± 21,33 nm e índice de polidispersividade (PDI) de 0,359 ± 0,059 via espalhamento dinâmico de luz e nanoestruturas esféricas com diâmetro de 16,98 ± 2,14 nm por microscopia eletrônica de transmissão. As análises térmicas da nano α-la indicaram um decaimento de massa entre 25 e 84 ºC por termogravimetria (TGA) e a calorimetria diferencial de varredura (DSC) resultou em uma entalpia de 1480 $J \cdot g^{-1}$ para desnaturação a 57,44 ºC. O incremento e a estabilidade da espuma da nano α-la pura foi maior quando comparado com a espuma da α-la nativa pura. A atividade de emulsão da nano α-la pura e α-la nativa pura foram iguais, entretanto o tempo de estabilidade da espuma para a nano α-la foi maior. A atividade antimicrobiana em *Listeria monocytogeneses* em ensaios de microplaca mostrou que o tempo de geração e a taxa de geração da nano α-la pura e α-la nativa pura foram iguais, sendo que ambas as estruturas apresentaram atividade antimicrobiana. Os bioativos encapsulados que foram encapsulados são a quercetina e vitamina B2 em nano α-la pura e em α-la nativa pura. A eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação foram: de 98,50 ± 0,28 % e 74,32 ± 1,22 % (nano α-la + quercetina), 69,36 ± 0,82 % e 12,38 ± 0,15 % (nano α-la + vitamina B2), 84,47 ± 2,27 % e 28,97 ± 5,96 % (α-la nativa + quercetina) e 74,74 ± 1,92 % e 19,25 ± 1,24 % (α-la nativa + vitamina B2). O raio hidrodinâmico da nano α-la + quercetina foi de 308 ± 26,80 nm, PDI de 0,506 ± 0,05 e potencial zeta de -47,93 ± 3,07 mV, a quercetina foi um estabilizador eletrostático para a nano α-la pura. A vitamina B2 serviu como agente de nucleação para a agregação da nano α-la pura, elevando o raio hidrodinâmico acima de 1000 nm. A presença da quercetina alteram a estabilidade térmica das proteínas pelas análises de TG e DSC, aumentando a energia necessária para a desnaturação da proteína. A presença da vitamina B2 não alterou a estabilidade térmica, do sistema proteico. A liberação controlada *in vitro* simulando fluido gastrointestinal mostrou que a quercetina é liberada mais devagar no fluido gástrico quando encapsulada em nano α-la pura quando comparada com a encapsulada em α-la nativa, sendo quase totalmente liberada em fluido gástrico com pH 1,2. A liberação controlada da vitamina B2 foi semelhante para ambos os sistemas encapsulados, o bioativo foi totalmente liberado no sistema gástrico com pH 1,2.

A metodologia de produção de queijo *minas frescal* com menor teor de sódio foi realizada seguindo planejamento experimental tipo Delineamento Central Composto Rotacional avaliando os efeitos da alteração das massas de NaCl e de KCl e o volume de nano α-la pura. Tendo como variáveis dependentes parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e condutividade elétrica) e os parâmetros da análise de perfil de textura (firmeza, mastigabilidade, coesividade, resiliência, elasticidade e adesividade). Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA para observar a influência das variáveis independentes. O pH, a acidez titulável e os sólidos solúveis não foram alterados, a condutividade elétrica teve variação diretamente proporcional as massas de ambos os sais. Dos parâmetros de textura apenas as análises estatísticas da adesividade indicou que influência significativa das variáveis independentes na resposta. Foi então determinado o ponto ótimo em: volume de 292 µL de nano α-la pura 2,00 $mg \cdot mL^{-1}$, 2,5 g de NaCl e sem adição de KCl para 500 mL de leite. Foram produzidos queijos seguindo a metodologia em ponto ótimo substituindo a nano α-la pura pelos encapsulados que apresentaram maiores valores de EE% e LC%. Os queijos com bioativos (quercetina e vitamina B2) apresentaram características físico-químicas e de perfil de textura compatíveis para queijos *minas frescal*, ou seja, não houve alterações em suas propriedades. O uso do planejamento experimental do tipo DCCR possibilitou o estudo do comportamento das alterações das concentrações de NaCl, KCl e nano α-la pura e com bioativos encapsulados nas características físico-químicas e de textura de queijos *minas frescal*. Gerando dados que otimizam a produção, que poderão contribuir para estudos futuros de análise sensorial e aceitação do consumidor.

Palavras-Chave: Nutracêutico, nanoproteína, soro do leite, laticínio, encapsulamento, planejamento experimental.

ABSTRACT

The use of pure α-lactalbumin nanostructured (pure nano α-la) and encapsulated bioactive in pure nano α-la as a partial substitute for NaCl in the production of *minas frescal* cheese was tested in this work, to produce a cheese with lower sodium content and without maintenance of the properties technical-functional given the need to reduce the consumption of NaCl that damages human health. The hydrodynamic radius of the obtained pure nano α-la was 191.10 ± 21.33 nm and PDI 0.359 ± 0.059 via dynamic light scattering and spherical nanostructures with a hydrodynamic radius of 16.98 ± 2.14 nm by transmission electron microscopy. Thermal analysis of nano α-la indicated a mass decay between 25 and 84 ºC by thermogravimetry (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) resulted in an enthalpy of 1480 $J \cdot g^{-1}$ for denaturation at 57.44 ºC. The increment and stability of pure nano α-la foam was greater when compared to pure native α-la foam. The emulsion activity of pure nano α-la and pure native α-la were the same, however the foam stability time for nano α-la was higher. The antimicrobial activity in *Listeria monocytogeneses* in microplate assays showed that the generation time and generation rate of pure nano α-la and pure native α-la were equal, with both structures showing antimicrobial activity. The encapsulated bioactive that were encapsulated are quercetin and vitamin B2 in pure nano α-la and in pure native α-la. The encapsulation efficiency and loading capacity were: 98.50 ± 0.28% and 74.32 ± 1.22% (nano α-la + quercetin), 69.36 ± 0.82% and 12.38 ± 0.15% (nano α-la + vitamin B2), 84.47 ± 2.27% and 28.97 ± 5.96% (native α-la + quercetin) and 74.74 ± 1.92 % and 19.25 ± 1.24% (native α-la + vitamin B2). The hydrodynamic radius of nano α-la + quercetin was 308 ± 26.80 nm, PDI of 0.506 ± 0.05 and zeta potential of -47.93 ± 3.07 mV, quercetin was an electrostatic stabilizer for pure nano α-la. Vitamin B2 served as a nucleation agent for the aggregation of pure nano α-la, raising the hydrodynamic radius above 1000 nm. The presence of quercetin alters the thermal stability of proteins by TG and DSC analysis, increasing the energy required for protein denaturation. The presence of vitamin B2 did not change the thermal stability of the protein system. *In vitro* controlled release simulating gastrointestinal fluid showed that quercetin is released more slowly into gastric fluid when encapsulated in pure nano α-la when compared to that encapsulated in native α-la, almost totally released into gastric fluid with pH 1.2. The controlled release of vitamin B2 was similar for both encapsulated systems, the bioactive was fully released into the gastric system at pH 1.2. The methodology to produce *minas frescal* cheese with lower sodium content was carried out following experimental planning type Central Composite Rotational Design evaluating the effects of changing the masses of NaCl and KCl and the volume of pure nano α-la. Having as

dependent variables physicochemical parameters (pH, titratable acidity, total soluble solids, and electrical conductivity) and the texture profile analysis parameters (firmness, chewiness, cohesiveness, resilience, elasticity, and adhesiveness). The results were statistically analyzed by ANOVA to observe the influence of independent variables. The pH, the titratable acidity and the soluble solids were not altered, the electrical conductivity had a variation directly proportional to the mass variation of both salts. The texture parameters only the statistical analysis indicated that the adhesiveness significant influence of the independent variables in the response. The optimum point was then determined in: volume of 292 µL of pure nano α-la 2.00 $mg \cdot mL^{-1}$, 2.5 g of NaCl and without addition of KCl for 500 mL of milk. Cheeses were produced following the optimal point methodology, replacing the pure nano α-la by the encapsulated ones that presented higher values of EE% and LC%. The cheeses with bioactive (quercetin and vitamin B2) showed physicochemical characteristics and texture profile compatible with Minas fresh cheeses, that is, there were no changes in their properties. The use of design of experiments such as DCCR type enabled to study the what happen with concentrations variation of NaCl, KCl and nano α-la pure and with bioactive encapsulated in the physicochemical and texture characteristics of *minas frescal* cheeses. Generating data that optimize production, which may contribute to future studies of sensory analysis and consumer acceptance.

Keyword: Nutraceuticals, nanoprotein, whey, dairy products, encapsulation, Design of experiments (DOE).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS xiii
LISTA DE FIGURAS xiv
NOTAÇÕES xv
1. INTRODUÇÃO 16
2. OBJETIVOS 18
2.1. Geral 18
2.2. Específicos 18
3. Revisão Bibliográfica 19
3.1. Nanociência e Nanotecnologia 19
3.1.1. Breve Histórico 19
3.2. Definições da Nanotecnologia 22
3.3. Os diferentes tipos de nanomateriais e síntese. 22
3.4. Nanotecnologia na indústria 25
3.5. Nanoestruturas de α-lactoalbumina 26
3.6. Nutracêuticos e Alimentos Funcionais 28
3.7. Bioativos: Quercetina e Vitamina B2 30
3.8. Indústria de laticínios: Queijo Minas Frescal 33
4. Material e Métodos 38
4.1. Material 38
4.2. Obtenção de nanoestrutura de α-lactoalbumina pura 38
4.3. Caracterização de α-lactoalbumina nanoestruturada 38
4.3.1. Determinação do tamanho e da polidispersão da nanoestrutura 38
4.3.2. Estabilidade de tamanho e microbiológica da nano α-lactoalbumina pura 39
4.3.3. Análise térmica de α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada pura 39
4.3.4. Análise do tamanho e morfologia da nano α-la pura via Microscopia Eletrônica de Transmissão 39
4.4. Atividade antimicrobiana da α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada pura 40
4.5. Estabilidade da Espuma 40
4.6. Estabilidade da Emulsão 41
4.7. Encapsulação de quercetina e vitamina B2 em α-lactoalbumina nanoestruturada e nativa 41
4.8. Liberação Controlada *in* vitro simulando fluido gastrointestinal 43
4.9. Produção de Queijo Minas Frescal 43
4.9.1. Análises Físico-químicas 45

4.9.2. Análise de Perfil de Textura (TPA) de queijo 45
4.10. Queijos com bioativos nano encapsulados 46
4.11. Análises Estatísticas 46
5. Resultados e Discussão 46
5.1. Obtenção e caracterização da α-lactoalbumina nanoestruturada pura 46
5.1.1. Estabilidade da α-lactoalbumina nanoestruturada pura em relação ao tempo 51
5.2. Atividade antimicrobiana 52
5.3. Propriedades de espuma e emulsão 55
5.4. Encapsulação de Bioativos em α-lactoalbumina 57
5.5. Liberação controlada *in vitro* 65
5.6. Queijo Minas Frescal 70
5.6.1. Análises Físico-químicas 70
5.6.2. Análises de Perfil de Textura 76
5.7. Queijo minas frescal com bioativos nano encapsulados 85
6. Conclusão 86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87
Apêndice A. Resultados de análises estatísticas dos ensaios físico-químicos dos queijos *minas frescal*. 97
Apêndice B. Resultados de análises estatísticas da Análise de Perfil de Textura (TPA) dos queijos *minas frescal*. 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais atividades e programas brasileiros desenvolvidos pelo Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação sobre Nanotecnologia e seus respectivos objetivos. 20
Tabela 2. Terminologias para as diferentes nanoestruturas de acordo com suas características morfológicas. 23
Tabela 3. Exemplos de bioativos e seus benefícios para a saúde humana. 30
Tabela 4. Resumo das propriedades e das aplicações de quercetina e vitamina B2. 32
Tabela 5. Classificação dos queijos quanto a umidade e teor de gordura. 34
Tabela 6. Apresentação de diferentes trabalhos que utilizaram aditivos para a manufatura de queijo minas frescal, e a conclusão dos autores. 36
Tabela 7. Esquematização dos sistemas e das concentrações finais de Quercetina e de Vitamina B2 no teste de encapsulamento com α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada. 42
Tabela 8. Valores codificados e valores reais pelo DCCR para a matriz experimental de produção de queijo padrão, tendo como variáveis independentes a quantidade de NaCl, KCl e α-lactoalbumina nanoestruturada pura. 44
Tabela 9. Estabilidade de tamanho (nm), PDI e Potencial Zeta (mV) das nanoproteínas α-lactoalbumina em um período de 30 dias. 52
Tabela 10. Tempo de geração (g) em horas e taxa de geração (h^{-1}) do crescimento da Listeria monocytogenes na presença de diferentes concentrações de α-la nanoestruturada e nativa, calculas a partir dos resultados das análises de microplaca, com o teste de tukey ($p > 0,05$). 54
Tabela 11. Propriedades de incremento de volume de espuma e estabilidade de espuma ao longo do tempo para α-la nanoestruturada e nativa, com os respectivos testes de Tukey* ($p < 0,05$) 56
Tabela 12. Propriedade de índice de atividade de emulsão (IEA) em m^2g^{-1} e estabilidade de emulsão em min dos sistemas de α-la nanoestruturada e nativa, com os seus respectivos testes de Tukey ($p < 0,05$). 57
Tabela 13. Dados de eficiência de encapsulação e de capacidade de ligação da Quercetina em α-la nanoestruturada e nativa, com o teste de Tukey* ($p < 0,05$) 58
Tabela 14. Dados de eficiência de encapsulação e de capacidade de ligação da Vitamina B2 em α-la nanoestruturada e nativa, com o teste de Tukey* ($p < 0,05$) 60
Tabela 15. Comparação dos parâmetros de raio hidrodinâmico (nm), PDI e potencial zeta (mV) entre a nano α-la e os encapsulados quercetina e vitamina B2, com os índices do teste de Tukey ($p < 0,05$). 61
Tabela 16. Resultados obtidos nas análises físico-químicas de pH e acidez titulável seguindo o planejamento experimental DCCR para os queijos com nanoestruturas e para os queijos controle com seus testes de Tukey ($p = 0,01$). 71
Tabela 17. Resultados obtidos nas análises físico-químicas de teor de sólidos solúveis totais (ºBrix) e condutividade elétrica (µS/cm) seguindo o planejamento experimental DCCR para os queijos com nanoestruturas e para os queijos controle com seus testes de Tukey ($p = 0,01$). . 73
Tabela 18. Resultados obtidos na análise de perfil de textura realizada no Texturômetro seguindo os ensaios do delineamento apresentando os valores de adesividade, elasticidade. . 76

Tabela 19. Resultados obtidos na análise de perfil de textura realizada no Texturômetro seguindo os ensaios do delineamento e os pontos de controle, apresentando os valores de Dureza (N) e Mastigabilidade (N). 82
Tabela 20. Resultados obtidos na análise de perfil de textura realizada no Texturômetro seguindo os ensaios do delineamento e os pontos de controle apresentando os valores de Resiliência e Coesividade. 83
Tabela 21. Referências de queijo minas frescal com resultados de TPA descrevendo o tipo de queijo e os parâmetros básicos para a análise de textura. 84
Tabela 22. Resultados das análises físico-químicas (FQ) e de perfil de textura (TPA) para os queijos otimizados com adição de quercetina (QQ) e vitamina B2 (QV) encapsulados em α-la nanoestruturada. 86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma do ecossistema de inovação em nanotecnologia no Brasil, representando as atividades governamentais dentro do Programa de Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia. 20
Figura 2. Métodos de síntese de nanoestruturas: da maior estrutura pra a menor, Top-down e da menor estrutura para a maior, bottom-up 24
Figura 3. Estrutura cristalina da α-lactoalbumina bovina 26
Figura 4. Esquematização genérica da produção de queijo minas frescal. 35
Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão das nanoproteínas α-lactoalbumina obtida por auto organização em solução NaCl 10 $mmol \cdot L^{-1}$ a 160 rpm e temperatura ambiente. 47
Figura 6. Curva da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC). A) nano α-lactoalbumina sintetizada em solução de NaCl 10,00 $mmol \cdot L^{-1}$, 25ºC e 160 rpm. B) α-lactoalbumina em solução de NaCl 10,00 $mmol \cdot L^{-1}$. 50
Figura 7. Curva de crescimento microbiano de Listeria monocytogenes MCTC 10059 na presença de diferentes concentrações de A) nano α-la e B) α-la nativa 53
Figura 8. Curva da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC). A) nano α-la + quercetina $300 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot mL^{-1}$. B) quercetina 300 $mmol \cdot mL^{-1}$. 62
Figura 9. Curva da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC). A) nano α-la + vitamina B2. B) vitamina B2 $24 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot mL^{-1}$. 64
Figura 10. Dados da liberação controlada in vitro de quercetina encapsulada em α-la nanoestruturada simulando fluido gástrico sem e com pepsina, SG e SGP respectivamente e fluido intestinal sem e com pancreatina, SI e SIP respectivamente, com a representação dos índices de Tukey* ($p < 0,05$). 66
Figura 11. Dados da liberação controlada in vitro de quercetina encapsulada em α-la nativa simulando fluido gástrico sem e com pepsina, SG e SGP respectivamente e fluido intestinal sem e com pancreatina, SI e SIP respectivamente, com a representação dos índices de Tukey* ($p < 0,05$). 68
Figura 12. Análises estatística da influência das variáveis independentes nas respostas da variável dependente condutividade elétrica dos queijos minas frescal. A) Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados com 17 corridas e 3 fatores. B) Superfície de resposta 3D tendo como variáveis independentes as massas de NaCl e de KCl (g) adicionados no processo de produção de queijo. 74

Figura 13. Análises estatística da influência das variáveis independentes nas respostas da variável dependente adesividade dos queijos minas frescal. A) Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados com 17 corridas e 3 fatores. B) Superfície de resposta 3D tendo como variáveis independentes a massa de NaCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo. C) Superfície de resposta 3D tendo como variáveis independentes a massa de KCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo.....77

NOTAÇÕES

α-la	α-lactoalbumina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
DCNT	Doenças Crônicas não transmissíveis
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DSC	Calorimetria Exploratória de Varredura
EE	Eficiência de encapsulação
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Capacidade de Ligação
MCTI	Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MS	Ministério da Saúde
Nano α-la	Nanoestruturas de α-lactoalbumina
NASA	*Nacional American Space Agencie*
NNI	*National Nanotechnological Initiative*
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBN	Programa Brasileiro de Nanotecnologia
PDI	Índice de Polidispersividade
PNS	Plano Nacional de Saúde
RH	Raio Hidrodinâmico
TGA	Análise Termogravimétrica
TPA	Análise de Perfil de Textura

1. INTRODUÇÃO

A população brasileira consome altos níveis de sódio o que leva o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como hipertensão arterial e consequentemente doenças cardiovasculares mais graves e até mesmo o óbito (COGSWELL; MUGAVERO; BOWMAN; FRIEDEN, 2016; DUNCAN; CHOR; AQUINO; BENSENOR *et al.*, 2012). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2020, ocorreram 11.603 óbitos por doença cardíaca hipertensiva e segundo a Pesquisa Nacional de Saúde cerca de 38,1 milhões de pessoas são hipertensas. O governo brasileiro desenvolveu uma série de políticas norteando a diminuição do consumo de sódio pela população. O Plano Nacional de Saúde (PNS) 2020-2023 divide em duas etapas a redução de sódio em alimentos processados. A primeira etapa refere-se à promoção da produção e consumo de alimentos saudáveis enquanto, a segunda refere-se à realização de ações educativas. O ministério da saúde espera que com a aplicação do PNS, se alcance o consumo *per capita* recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 5 g de sal diários.

As políticas do PNS afetam diretamente a indústria de laticínios que são conduzidas a elaborar novas formulações para os produtos processados ou minimamente processados, que cumpram com as metas de saúde pública estabelecidas, sem prejudicarem as propriedades sensoriais do produto. Um dos produtos mais afetados pela redução de sal é o queijo, pois, o alto teor de NaCl é fundamental para a obtenção das características sensoriais finais, para a sua preservação e solubilização de proteínas. O queijo *minas frescal* é um dos mais consumidos no Brasil e muito popular no estado de Minas Gerais. O *minas frescal* é um queijo de massa crua, coloração esbranquiçada, consistência mole e massa fechada com umidade entre 55%, cuja salga é uma etapa importante para o produto final (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007). Portanto, é um produto que necessita de alterações para manter as suas características, e se necessário, diminuir o teor de sal para cumprir com as diretrizes de saúde.

Existem algumas alternativas para a substituição de cloreto de sódio na formulação de queijos, como por exemplo o uso de cloreto de potássio. Apesar da substituição por cloreto de potássio não apresentar alterações na composição e nas características físico-químicas dos queijos, causa alterações na textura com o endurecimento da massa e altera o sabor conferindo ao alimento sabor metálico (SILVA; BALTHAZAR; ESMERINO; NETO *et al.*, 2018). Outros substituintes são sais emulsificantes como fosfato de potássio e citrato de potássio, que podem contribuir para manter as propriedades dos queijos (MOZURAITYTE; BERGET; MAHDALOVA; GRØNSBERG *et al.*, 2019). Entretanto, é incipiente na literatura o uso de proteínas

nanoestruturadas, que também são emulsificantes podendo contribuir nas propriedades dos queijos.

O uso de proteínas nanoestruturadas em produtos láticos é uma ferramenta que pode ser utilizada para mitigar os desafios da indústria de laticínios, pois pode auxiliar na intensificação das propriedades técnico-funcionais, como formação de espuma, gelificação, controle de sinérese, solubilidade, e além disso, tem potencial para conferir propriedades nutracêuticas aos alimentos (BOGGIONE SANTOS; HERNANDEZ HERNANDEZ; CARDOSO COSTA; DE QUEIROZ LAFETÁ *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ; SANTOS; OLIVEIRA; TEÓFILO *et al.*, 2020). Entre essas proteínas destaca-se a α-lactoalbumina (α-la), uma proteína que corresponde a 25% das proteínas do soro do leite (PEREIRA, 2009), e que quando nanoestruturada pode ser uma alternativa tecnológica para reduzir o teor do NaCl em formulações de queijos, devido às suas propriedades técnico-funcionais (SANTOS; SARAIVA; MONTEIRO; DOS REIS COIMBRA, 2019).

Além dos benefícios das propriedades técnico-funcionais, as nanoestruturas de α-lactoalbumina (nano α-la) podem ser usadas como um agente encapsulante de bioativos o que possibilita a proteção e a liberação controlada de moléculas benéficas para a saúde humana, melhorando a absorção pelo organismo (MOHAMMADIAN; WALY; MOGHADAM; EMAM-DJOMEH *et al.*, 2020). Sendo assim, o uso de nanoestruturas de α-la contendo bioativos em queijo *minas frescal* possibilita a produção de um alimento nutracêutico. Esta nanoestrutura pode atuar na prevenção de doenças e na manutenção fisiológica do consumidor (GUPTA; SRIVASTAVA; PANDEY, 2012; MOHAMMADIAN; WALY; MOGHADAM; EMAM-DJOMEH *et al.*, 2020). Ampliando a oferta de produtos nutracêuticos no mercado.

Neste panorama, este projeto objetiva a obtenção e a caracterização de nanoestruturas de α-lactoalbumina pura e com quercetina e vitamina B2 encapsulados para a adição em queijo do tipo *minas frescal* com o intuito de diminuir a quantidade de sal (cloreto de sódio).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Obtenção e caracterização de nanoestruturas de α-lactoalbumina com e sem bioativos encapsulados e avaliação das alterações das propriedades do queijo tipo *minas frescal* com a incorporação da proteína nanoestruturada pura e com bioativos encapsulados para a substituição parcial do cloreto de sódio.

2.2. Específicos

1. Obter nanoestruturas de α-lactoalbumina e caracterizá-las via espalhamento de luz dinâmica, microscopia eletrônica de transmissão e análise térmica.
2. Avaliar a estabilidade do tamanho, microbiológica, de espuma e de emulsão das nano α-lactoalbumina
3. Encapsular a quercetina e vitamina B2 em α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada, determinar a eficiência de encapsulação e capacidade de ligação.
4. Caracterizar via espalhamento de luz dinâmico e análises térmicas os bioativos encapsulados em α-lactoalbumina nanoestruturada.
5. Estudar a liberação controlada *in vitro* em fluido gastrointestinal da quercetina e vitamina B2 encapsuladas em α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada.
6. Produzir do queijo *minas frescal* utilizando planejamento experimental do tipo DCCR alterando as concentrações de sais (NaCl e KCl) e α-lactoalbumina nanoestruturada pura e analisar o pH, a condutividade elétrica, a acidez titulável, os sólidos solúveis e o perfil de textura para determinar o ponto ótimo das condições de produção.
7. Avaliar as características físico-químicas (pH, acidez titulável sólidos solúveis e condutividade elétrica) e o perfil de textura dos queijos minas frescal produzidos de acordo com a metodologia estabelecida do ponto ótimo com os bioativos encapsulados em α-lactoalbumina nanoestruturada.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Nanociência e Nanotecnologia

3.1.1. Breve Histórico

A nanociência é uma área do conhecimento que visa o desenvolvimento e manipulação de estruturas a níveis atômicos. As novas tecnologias receberam o nome de nanotecnologia, a qual é apresentada como uma a revolução tecnológica que irá romper paradigmas tecnológicos e científicos do século XXI com grandes investimentos (BHUSHAN, 2016).

A linha histórica da nanotecnologia começa quando o cientista e prêmio Nobel de Química de 1925, Richard Zsigmondy apresentou o conceito de nanômetro a partir de estudos de dispersão coloidal de ouro em microscópios. Em 1959 o físico Richard Feynman ganhador do prêmio Nobel de física em 1965 por seu trabalho com eletrodinâmica quântica, apresentou um trabalho com o título "Há muito espaço lá embaixo", durante uma reunião da Sociedade Americana de Física. Isso lhe conferiu o título de pai da nanotecnologia moderna (HULLA; SAHU; HAYES, 2015). Entretanto, foi com Iijima, em 1991, que ocorreu um salto no desenvolvimento da nanotecnologia com estudos de nanotubos de carbono (HULLA; SAHU; HAYES, 2015; IIJIMA, 1991).

Desde então governos, empresas e pesquisadores investem capital financeiro e intelectual para o desenvolvimento de novos nanomateriais, com um amplo campo de aplicações. Nos Estados Unidos da América o investimento em nanotecnologia vem diretamente do gabinete da presidência da república (HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

A China aquece a competitividade do mercado com investimentos no setor da nanotecnologia, sendo uma das quatro áreas principais de investimento, ocupando espaço de parceira e competidora dos EUA (GAO; JIN; SHEN; SINKO *et al.*, 2016). A União Europeia também investe em pesquisa e desenvolvimento de produtos nanotecnológicos (JUSTO-HANANI; DAYAN, 2015).

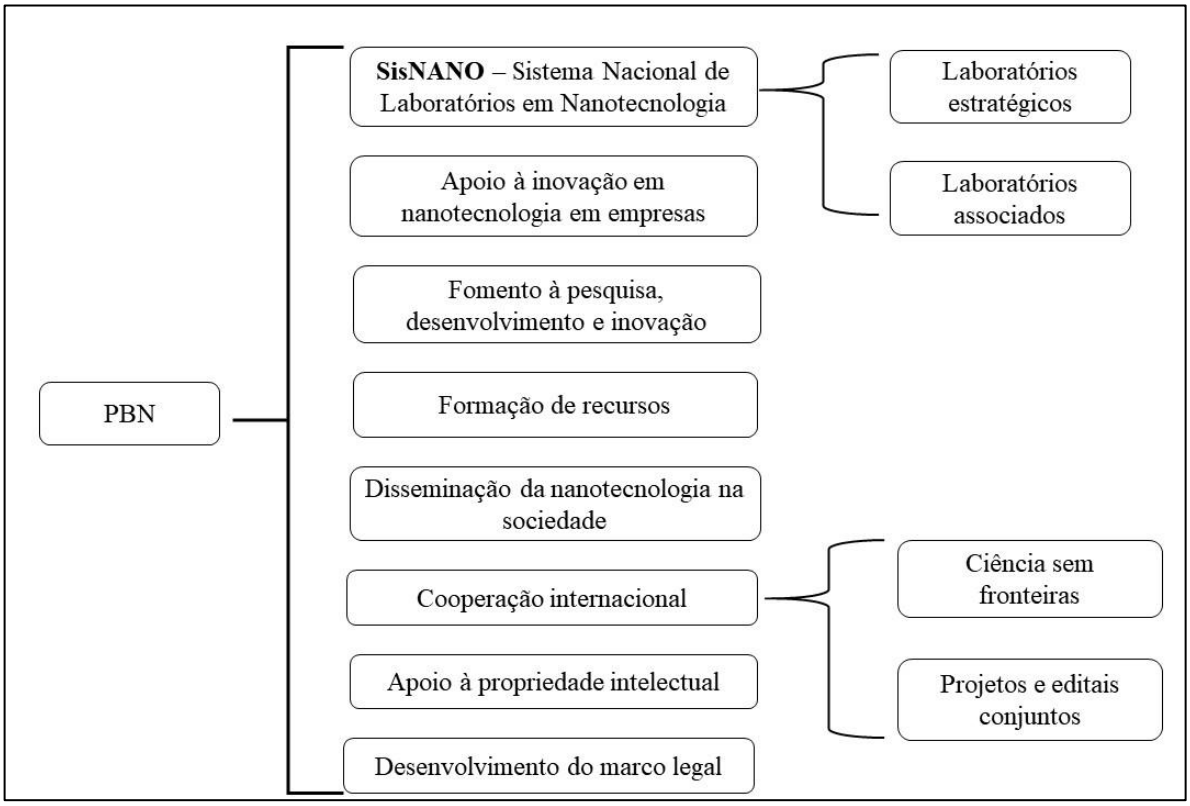
O Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC), Brasil, criou na Portaria n° 16 de maio de 2003, um grupo de trabalho para desenvolver o Programa Brasileiro de Nanotecnologia (PBN), a fim de não perder a competitividade industrial. O PBN programa procura capacitar profissionais, desenvolver e proteger a propriedade intelectual via patentes, fomento de pesquisas e integração de laboratórios estratégicos no setor (PLENTZ; FAZZIO, 2013).

Em 2019, o MCTI elaborou o Plano de Ação de CT&I para Tecnologias Convergentes e Habilitadoras, sendo o primeiro volume sobre a nanotecnologia 2016-2023. O ministério

elaborou um plano de ação para o investimento em nanotecnologia, além de planos de ampliação da integração entre a academia e a indústria de vários setores. O objetivo é possibilitar a inserção das novas tecnologias no mercado, de acordo com áreas estratégicas para o desenvolvimento social e econômico brasileiro, seguindo diretrizes sustentáveis.

A Figura 1 apresenta a estrutura governamental do programa que está sendo desenvolvido até os dias atuais. A Tabela 1 apresenta as principais atividades e programas brasileiros desenvolvidos pelo Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação sobre Nanotecnologia e seus respectivos objetivos.

Figura 1. Organograma do ecossistema de inovação em nanotecnologia no Brasil, representando as atividades governamentais dentro do Programa de Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia.



Fonte: adaptado de PLENTZ e FAZZIO (2013)

Tabela 1. Principais atividades e programas brasileiros desenvolvidos pelo Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação sobre Nanotecnologia e seus respectivos objetivos.

Atividade	Objetivo	Status

Estratégia de implementação	Apoiar o SisNANO; fomentar pesquisa e projetos; fomentar modelos e programas	Primeira fase finalizada em 2018
Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN)	Integrar as ações governamentais; integrar o SisNANO e vários outros ministérios com áreas de interesse	Atual. Atualizado no Decreto nº 9.677 de 02 de janeiro de 2019
Centros de Inovação em Nanotecnologia (SibratecNANO)	Articular e financiar projetos de cooperação entre empresas e instituição de tecnologias com apoio do FINEP	Primeira fase finalizada em 2018
Centro Brasil-China de Pesquisa e Inovação em Nanotecnologia	Coordenar as atividades de cooperação entre os países, desenvolver programas e consolidar as atividades na área	Atual
Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia (CBAN)	Apoiar a execução de projetos conjuntos de pesquisa e desenvolvimento entre os dois países	Atual
NANOReg	Projeto de regulamentação internacional	Finalizado. Aguardando a liberação do relatório final pela OCDE

Fonte: Adaptado de https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/tecnologia/tecnologiasSetoriais/Plano-de-Acao-em-CTI_Nanotecnologia_FINAL.pdf

3.2. Definições da Nanotecnologia

As definições de nanotecnologia são diversas e vem sendo adaptadas desde o seu surgimento. O MCTIC define nanotecnologia como "*tecnologia transversal, disruptiva e pervasiva dedicada à compreensão, controle e utilização das propriedades da matéria na nanoescala (1,0·10^{-9} m, que equivale a 1 bilionésimo do metro)*".

A Agência Nacional Espacial Americana (NASA) define nanotecnologia como sendo a criação de materiais, dispositivos e sistemas funcionais através do controle e manipulação da matéria na escala de comprimento nanométrico, entre 1 e 100 nm, com a possibilidade de explorar novas propriedades químicas, mecânicas, elétricas ou biológicas.

A Iniciativa Norte americana para Nanotecnologia (US National Nanotechnology Initiative – NNI) define a nanotecnologia como a compreensão e o controle da matéria em nanoescala, com as dimensões entre 1 e 100 nm, com fenômenos diferentes e únicos que permitem novas aplicações.

A Comissão Europeia (EC) interpreta a nanotecnologia como um material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas, em seu estado não ligado, agregado ou aglomerado com 50% ou mais das partículas presentes possuem a distribuição do tamanho entre 1 e 100 nm, em uma ou mais dimensões externas. Em casos especiais de preocupações ambientais, de saúde e de segurança esse limite de distribuição pode ser de 1 a 50%.

De modo geral, a definição de nanotecnologia perpassa pelo fato de pelo menos uma das dimensões do material estar em tamanho com escala nanométrica. Alguns autores colocam esse tamanho até 100 nm, outros até 300 nm, ou ainda até 999 nm. Entretanto, o mais importante na nanotecnologia é a produção de um material com propriedades químicas, físicas, biológicas, óticas ou eletrônicas diferentes das estruturas originais, promovida pela modificação da razão área/volume do material (Editorial: Sustainable Nanotechnology, 2014; GRUÈRE, 2012; MALEKI DIZAJ; BARZEGAR-JALALI; ZARRINTAN; ADIBKIA *et al.*, 2015; MU; SPRANDO, 2010; SOM; BERGES; CHAUDHRY; DUSINSKA *et al.*, 2010; USKOKOVIĆ, 2007).

3.3. Os diferentes tipos de nanomateriais e síntese.

As definições de diferentes tipos de nanoestruturas, um termo genérico, são apresentadas na Tabela 2. A terminologia está relacionada a dimensionalidade e a forma do material.

Tabela 2. Terminologias para as diferentes nanoestruturas de acordo com suas características morfológicas.

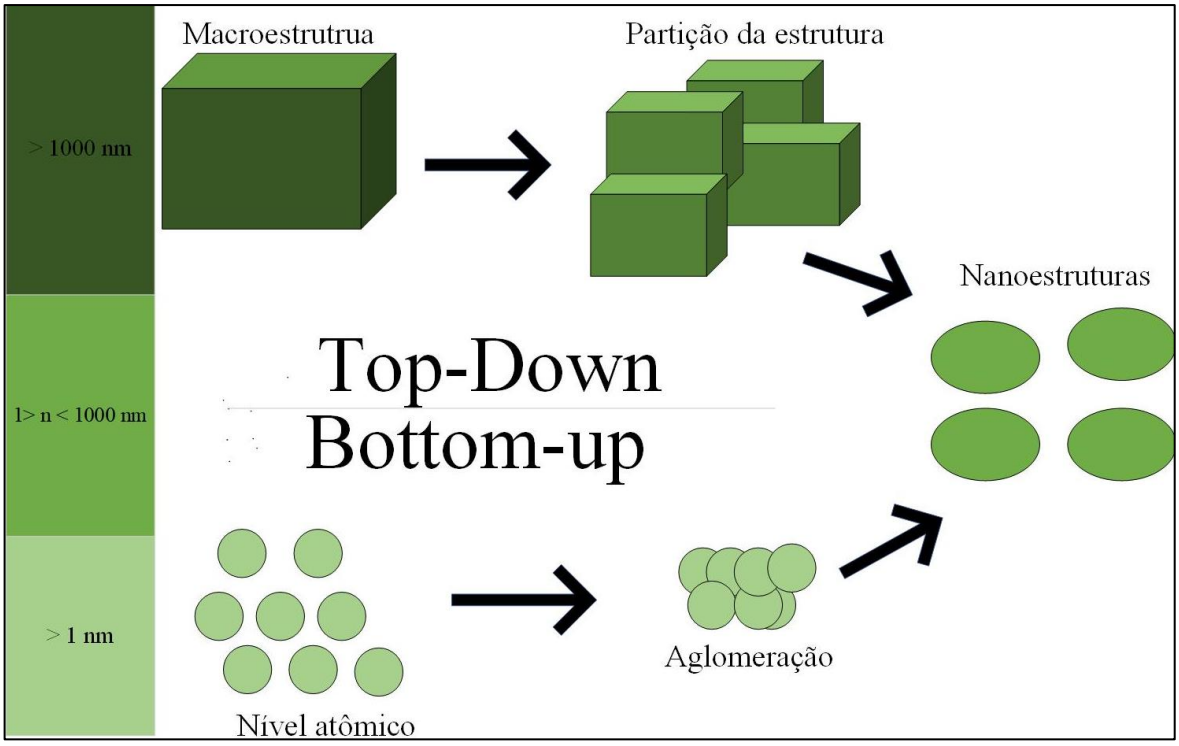
Classificação	Descrição	Fonte
Nanomateriais	Terminologia Geral	Todos os nanomateriais
Nanopartículas	Apresenta as 3 dimensões na escala nano, ou o raio para esferas	Ag, ZnO, Cu, Au
Nanotubos	Apresenta a direção radial na escala nano e é oco	Carbono, proteínas e quitosana
Nanofibra	Apresenta a direção radial na escala nano	Proteínas e quitosana
Nanocompósitos	Material heterogêneo sendo um dele nanomaterial	Biopolímeros com nanoestruturas, argilas
Nanofolha	Material com a espessura nanométrica, e a largura e comprimento maiores	Nanocelulose, grafeno
Nanoproteínas	Proteínas funcionais no tamanho nanométrico, propositalmente alteradas	α-lactoalbumina, β-lactoglobulina, lisina
Nanobiomateriais	Materiais biológicos manipulados para o tamanho nanométrico	Proteínas, carboidratos e lipídeos
Fulereno	Rearranjo estrutural do carbono	Estruturas de carbono
Pontos Quânticos	Semicondutores inorgânicos fluorescentes	Carbono, TiO_2

Fonte: adaptado de SINGH (2016).

Uma classificação mais geral dos processos de obtenção de nanoestruturas pode ser resumida em: *top-down* quando a síntese ocorre com a diminuição do tamanho dos reagentes para um produto nano e *bottom-up* em que o processo vai do menor tamanho até o tamanho na escala nanométrica (IQBAL; PREECE; MENDES, 2012; SCHMIDT; DENEKE; NAKAMURA;

ZAPF-GOTTWICK *et al.*, 2002). A Figura 2 resume os processos, de forma ilustrativa e genérica.

Figura 2. Métodos de síntese de nanoestruturas: da maior estrutura para a menor, Top-down e da menor estrutura para a maior, bottom-up.



Fonte: Autor.

De uma forma mais específica, os métodos para obtenção de nanoestruturas de proteínas são gelificação física, por meio de aquecimento ou resfriamento; gelificação química com a adição de sais ou controle de pH; e gelificação biológica com o uso de enzimas ou microrganismos também podem ser nanoestruturadas por emulsão e spray-dryer (IRAVANI; KORBEKANDI; MIRMOHAMMADI; ZOLFAGHARI, 2014). As alterações nas condições impostas à proteína causa a hidrólise parcial e reassociação das proteínas que buscam um estado termodinâmico mais favorável; se agregam formando géis em escala nanométrica (BOGGIONE SANTOS; HERNANDEZ HERNANDEZ; CARDOSO COSTA; DE QUEIROZ LAFETÁ *et al.*, 2019). HERNÁNDEZ; SANTOS; OLIVEIRA; TEÓFILO *et al.* (2020) sintetizaram conjugados de α-lactoalbumina com goma tara utilizando *spray-dryer* e liofilização. LIANG; YAN; YANG; KIM *et al.* (2016) estudaram a síntese e liberação controlada de conjugados de quitosana e β-lactoglobulina nanoestruturadas por gelificação iônica. Nanolipases foram sintetizadas por microemulsão, conjugada com polímeros como apresentado no estudo feito por SAY; KEÇILI;

BIÇEN; ŞIŞMAN *et al.* (2011). A escolha do método depende da proteína e do custo-benefício para a aplicação industrial.

3.4. Nanotecnologia na indústria

As nanotecnologias são empregadas em diversos setores da indústria, com uma gama ainda maior de finalidades, no processo produtivo ou como insumo. No setor de cosmético, os nanomateriais são utilizados como carreadores de drogas encapsuladas ou como ingredientes, a exemplo o nano TiO_2 e nano ZnO são utilizados em filtros solares eficientes para proteção ultra violeta (UV) (MU; SPRANDO, 2010)

Na área da saúde e farmacêutica, os nanomateriais atuam como carreadores de princípios ativos e formuladores (RAFFA; VITTORIO; RIGGIO; CUSCHIERI, 2010). Também estão presentes em materiais microeletrônicos e de geração de energia (YEH, 2013). Na agricultura, o desenvolvimento de nanofertilizantes, nanopesticidas e nanosensores permitem o monitoramento ambiental, e são instrumentos que ampliam a qualidade e quantidade da produção com ganhos econômicos (GRUÈRE, 2012; IAVICOLI; LESO; BEEZHOLD; SHVEDOVA, 2017).

Na indústria de alimentos, a nanotecnologia possibilita o desenvolvimento de embalagens ativas que preservam alimento fresco por maior tempo, criando barreiras mais eficientes contra patógenos devido a presença de agentes antimicrobianos, além de possibilitar o controle da transferência de massa de oxigênio e água. As embalagens interagem diretamente com o consumidor através de sensores que interagem com compostos consequentes da degradação dos alimentos ou microrganismos patogênicos (ROONEY, 2005; VANDERROOST; RAGAERT; DEVLIEGHERE; DE MEULENAER, 2014). A nanotecnologia permite desenvolver dispositivos com maior sensibilidade, especificidade, menor tempo de resposta e com menor uso de reagentes (SOZER; KOKINI, 2009).

BIANCHI; SCHLOGL; SANTOS; JUNIOR *et al.* (2019) estudaram a influência de um revestimento de goma tara com nanoestruturas de carbonato de cálcio em goiabas no pós-colheita. Os autores observaram que o revestimento com a nano foi capaz de retardar o processo de maturação da fruta, o que foi observado pelas alterações em dureza, perda de massa e o índice de escurecimento, sem alterar as demais características físico-químicas do fruto. As nanopartículas de prata (AgNP) em revestimento de goma tara foram estudadas por DE SOUZA; BIANCHI e SANTOS (2018) para a preservação de banana *caturra* no pós-colheita.

Os revestimentos com 5 % (m/v) de AgNPs foram capazes de retardar o amadurecimento das bananas, conferindo maior firmeza e mantendo o brilho do fruto.

DA SILVA; SANTOS; BIANCHI; LEITE *et al.* (2018) desenvolveram um sensor para o herbicida glifosato utilizando nanoestruturas de hidróxido de cobalto II, com limite de detecção mais baixo e com maior praticidade de aplicação do que os métodos tradicionais. LABROO e CUI (2013) desenvolveram um nanosensor a base de grafeno para a detecção de lactato. GHAANI; NASIRIZADEH; YASINI ARDAKANI; MEHRJARDI *et al.* (2016) usaram nanopartículas de prata com delfinidina em eletrodo de vidro carbono modificado para a detecção de ácido gálico em alimentos.

Como ingredientes os nanomateriais tem a função de melhorar emulsões, encapsular compostos bioativos para tornar alimentos nutracêuticos e funcionais, conservantes, influenciando no sabor e na textura (DUNCAN, 2011; RASHIDI; KHOSRAVI-DARANI, 2011). As propriedades singulares dos nanomateriais possibilitam seu uso como agente encapsulantes de vitaminas ou drogas, possibilitando uma melhor liberação controlada e protegendo o bioativo das adversidades do meio externo (HAMAD; AL-SHARIFY; AL-NAJJAR; GADOOA, 2020; MATSUNO; ADACHI, 1993; WEISS, 2006).

3.5. Nanoestruturas de α-lactoalbumina

Nanoproteínas e seus conjugados são largamente utilizadas na manufatura de produtos com maiores valores nutricionais e econômicos agregados devido às suas propriedades técnico-funcionais, em destaque, solubilidade, formação de espuma, emulsificantes e gelificantes (HERNÁNDEZ; SANTOS; OLIVEIRA; TEÓFILO *et al.*, 2020).

A α-lactoalbumina (α -la), proteína em estudo neste trabalho, é uma pequena proteína do soro do leite, com 123 aminoácidos, ponto isoelétrico de 4,8 e massa molar de 14,7 kDa (DELAVARI; SABOURY; ATRI; GHASEMI *et al.*, 2015; PERMYAKOV; BERLINER, 2000). Sua forma nativa possui dois domínios: entre os resíduos 5-11, 23-24 e 86-98 cujo domínio é com predominância de α-hélice e entre os resíduos 41-44, 47-50 e 55-60 que representa a região folha-β. Os demais resíduos fazem ligações de hidrogênio e ponte dissulfeto (4 ao total) fornecendo a estrutura terciária da proteína (PERMYAKOV; BERLINER, 2000; WARME; MOMANY; RUMBALL; TUTTLE *et al.*, 1974). A Figura 3 ilustra a estrutura da α-la bovina.

Figura 3. Estrutura cristalina da α-lactoalbumina bovina.

Fonte: (CHRYSINA; BREW; ACHARYA, 2000); retirado de https://www.rcsb.org/structure/1F6S

A nanoestruturação da α-la é apresentada em diversos trabalhos, cada um indicando uma condição de síntese, seja da proteína nativa ou de algum conjugado. OTTE; IPSEN; BAUER; BJERRUM *et al.* (2005) produziram géis de α-la por hidrolise enzimática usando protease de *Bacillus licheniformis* (BLP) em pH 7,5 e 50 ºC, resultando em fibrilas com 5 nm de diâmetro. TARHAN; TARHAN e HARSA (2014) sintetizaram nanotubos de α-la com tamanhos de 20 a 100 nm ao solubilizar a proteína nativa em tampão Tris-HCl 75 $mmol \cdot L^{-1}$ em pH 7,5 na presença de $CaCl_2$ na proporção 2:1 e 4 % (m/m) de BLP e incubá-las a 50 °C. O rearranjo das proteínas para a formação de nanotubos ou nanofribilas está diretamente relacionada à concentração de Ca^{2+} na síntese; o íon serve como núcleo para a organização da estrutura proteica e em baixas concentrações ocorre a formação de fibrilas (GRAVELAND-BIKKER; IPSEN; OTTE; DE KRUIF, 2004; IPSEN; OTTE, 2007).

Outra metodologia para a nanoestruturação de α-la é a utilização de solventes orgânicos como agentes de dessolvatação. ARROYO-MAYA; RODILES-LÓPEZ; CORNEJO-MAZÓN; GUTIÉRREZ-LÓPEZ *et al.* (2012) comparou a utilização de três solventes orgânicos (etanol, propanol e acetona) para obtenção de nano a α-la. Utilizando etanol o tamanho foi de 246 nm e PDI 0,214; para o isopropanol o tamanho obtido foi de 324,9 nm com PDI de 0,179; e para a acetona o tamanho foi 152,3 nm com PDI de 0,166. A diferença entre os tamanhos foi atribuída

à polaridade de cada solvente e capacidade de fazer interações de hidrogênio e dissulfeto com a cadeia de proteína.

Conjugados com α-la foram apresentados por HERNÁNDEZ; SANTOS; OLIVEIRA; TEÓFILO *et al.* (2020) utilizando goma tara, seguindo planejamento experimental tendo como variáveis independentes a temperatura, pH e tempo de aquecimento (liofilização e spray-dryer). Utilizando a liofilização os tamanhos dos conjugados foram 289,5 nm (80 °C, pH 2 e 40 min), 124,6 nm (39,8 °C, pH 6,5 e 30 min), 167,7 nm (65 °C, pH 11 e 30 min) e 46,9 nm (65 ° C, pH 6,5 e 55,2 min); no spray-dryer os tamanhos encontrados foram 243,3 nm (50 °C, pH 9,2 e 15 min) 290,1 nm (50 °C, pH 9,2 e 45 min), 210,6 nm (39,8 °C, pH 6,5 e 30 min) e 121,4 nm (65 ° C, pH 6,5 e 55,2 min).

Portanto, pode-se observar que a nano α-lactoalbumina é facilmente nanoestruturada e suas propriedades permite que seja utilizada na indústria de alimentos como nanocarreadores de bioativos e melhoramento tecno-funcional de alimentos.

3.6. Nutracêuticos e Alimentos Funcionais

O Brasil do século XX enfrentou uma série de problemas com a fome e a subnutrição da população junto com doenças parasitológicas. Somado a isso, as mudanças políticas e sociais de distribuição de renda, ocasionaram uma transição no perfil alimentar e, consequentemente, nutricional da população geral, o que gerou o aumento do consumo de ultra processados ricos em sódio, açucares e gordura (SALGADO, 2016).

Esses hábitos alimentares levaram ao aumento de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs), que causam inúmeras mortes no Brasil e no mundo, sendo, portanto, importante o consumo de alimentos saudáveis para prevenção e melhoria na qualidade de vida, sem perder as necessidades nutricionais básicas. Como alternativa, a indústria busca o desenvolvimento de alimentos funcionais que possuem probióticos, fotoquímicos, prébioticos, vitaminas e antioxidantes, trazendo benefícios para a saúde física e mental (SILVA; SILVA; PEREIRA; VASSIMON, 2016).

Uma série de normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta e define critérios/questões sobre os alimentos e ingredientes funcionais. A Resolução Nº19 de 30 de abril de 1999 define Propriedade Funcional como "*aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou o não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento e outras funções normais do organismo humano*".

A importância de investimentos no incentivo a alimentação funcional, além dos benefícios à saúde humana, pode reduzir gastos públicos e privados no tratamento de doenças pois atua na contenção das doenças crônicas. Um nutracêutico pode ser definido quando o alimento possui compostos com propriedades nutricionais e farmacológicas, isso inclui a classe dos minerais, peptídeos, vitaminas e antioxidantes (SANTOS; ALBERT; LEANDRO, 2019). Em revisão apresentada por KALRA (2003) é proposto diferentes definições para alimentos funcionais e para alimentos nutracêuticos; quando os alimentos elaborados com o uso da ciência, de forma consciente ou não por quem prepara, são alimentos funcionais; são os alimentos que fornecem proteínas, gorduras, carboidratos e vitaminas ao organismo humano. Quando o alimento funcional, parte dele ou um componente a ele inserido previne e/ou trata doenças leva o nome de nutracêutico.

DOYON e LABRECQUE (2008) apresentam uma revisão com diferentes definições de alimentos funcionais, e concluem que alimentos funcionais são alimentos comumente presentes na dieta humana e que foi provado que seu consumo previne doenças crônicas especificas além de suas funções nutricionais básicas.

Para BIGLIARDI e GALATI (2013) alimentos funcionais são a combinação entre as relações nutricionais e satisfação sensorial com constituintes especiais que possuem efeitos fisiológicos vantajosos.

Os alimentos funcionais são chamados nutracêuticos quando possuem componentes que, se consumidos em forma de pílulas medicinais ou em shakes são benéficos para a saúde humana (SHAHIDI, 2009). Os nutracêuticos podem estar naturalmente presentes nos alimentos ou ainda serem adicionados a alimentos processados, tornando esse alimento mais benéfico à saúde.

Os componentes nutracêuticos são bioativos, como os probióticos, por exemplo bifidobactérias e lactobacilos presente em iogurtes, láticos fermentados e suplementos; os prébioticos como as fibras e os oligossacarídeos presentes em frutas, aveias e grãos; vitaminas, antioxidantes e compostos fenólicos que são encontradas em carnes e vegetais; e os ácidos graxos encontrados em peixes, nozes e óleos vegetais (FERRARI, 2004). Uma classificação geral dos compostos bioativos está resumida na Tabela 3.

Entretanto, esses bioativos possuem características físico-químicas que dificultam a absorção adequada pelo organismo, como hidrofobicidade, baixa resistência as condições do sistema gastrointestinal, ou ainda, não são capazes de se manterem nos alimentos processados pois se degradam com alterações de temperatura, pH, força iônica ou choques mecânicos (JONES; CABALLERO; DAVIDOV-PARDO, 2019). Como alternativa tecnológica para sanar este

problema são usados nanomateriais como sistemas de encapsulação e entrega controlada de bioativos, que podem melhorar a biodisponibilidade do nutracêutico nos alimentos e melhorar a absorção pelo organismo (JONES; CABALLERO; DAVIDOV-PARDO, 2019).
Esse trabalho, irá utilizar a quercetina e a vitamina B2 como bioativos para a suplementação do queijo minas frescal.

Tabela 3. Exemplos de bioativos e seus benefícios para a saúde humana.

Bioativo	Benefícios	Exemplos
Polifenóis	Prevenção de câncer, diabetes, inflamações, infecções virais e microbiana e cardioprotetor.	Flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e curcuminóides
Carotenoides	Regulação hormonal e imunológica, atividade anticâncer, antioxidante, comunicação intracelular, cardioprotetor e regulador gastrointestinal.	Carotenos e xantofilas (licopeno, luteína, zeaxantina, β-caroteno
Fibras	Prevenção de doenças cardiovasculares, colesterol e diabetes.	Carboidratos insolúveis e solúveis não digeríveis. Lignina e celulose
Esteroides	Regulação dos níveis de LDL, necrose de células apoptóticas, inflamações, imunossupressores	Fitosteróis, esteróis de plantas
Lipídeos	Alteração dos níveis de lipídeos circulatórios, anti-inflamatório e cancerígeno, controle de diabetes.	Ácidos graxos como ω-3 e ω-6
Peptídeos	Controle de hipertensão, atividade antioxidantes e imunomodulação.	Proteínas clivadas contendo de 3 a 20 aminoácidos
Micronutrientes	Crescimento, manutenção e desenvolvimento do corpo.	Vitaminas e Minerais

Adaptado de: JONES; CABALLERO e DAVIDOV-PARDO (2019)

3.7. Bioativos: Quercetina e Vitamina B2

Os flavonoides representam uma classe de moléculas encontrada em vegetais e frutas que protegem o sistema cardiovascular, renal e hepático, além de possuírem um potencial antioxidante e anticancerígeno. A quercetina pertence a subclasse das flavonóis e é encontrada

em alimentos como cebolas, tomates, maçãs, uvas, sementes e castanhas (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

A Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona - $C_{15}H_{10}O_7$)) de acordo com a IUPAC, é uma molécula aglicona que possui grupamentos hidroxilas nas posições 3',4',5,7 de sua cadeia, sendo um pó cristalino de coloração amarela, solúvel em álcool e lipídeos apresentando formas de cadeia com grupos metila, sulfato, glicosil e glucoroníde (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008). O mecanismo das propriedades funcionais da quercetina é explicado pela capacidade de quelar íons metálicos, como ferro e de sequestrar radicais livres como hidroxilas e oxigênio além de ter atuação inibitória nas enzimas xantina oxidase e a peroxidase lipídica. Os radicais livres são moléculas que apresentam elétrons desemparelhados que provocam estresse oxidativo em macromoléculas que levam a degenerar ou mudar sua estrutura o que pode causar uma série de doenças cardiovasculares e até mesmo câncer (LESJAK; BEARA; SIMIN; PINTAĆ *et al.*, 2018; POPRAC; JOMOVA; SIMUNKOVA; KOLLAR *et al.*, 2017; ZHANG; SWARTS; YIN; LIU *et al.*, 2011).

O consumo de alimentos que possuem flavonoides seja de fonte natural ou adicionados a processados podem prevenir doenças sendo um hábito importante para a qualidade da saúde humana.

A Vitamina B2, conhecida como Riboflavina, é um composto importante para a regulação do metabolismo humano estando presente em todas as células. Sua principal fonte são vegetais e leite (BACHER; EBERHARDT; FISCHER; KIS *et al.*, 2000). As vitaminas, são compostos orgânicos essenciais para a dieta e saúde humana, atuando como cofatores em funções fisiológicas. Como não são armazenadas e nem produzidas no organismo humano, ocorre a necessidade de ingestão por meio do consumo de vegetais, ovos e carnes (MACK; GRILL, 2006).

O nome IUPAC para a Vitamina B2 é 7,8-dimetil-10-ribitil-isoaloxazina, sendo uma molécula de isoalaxazina com cadeias laterais metil e ribitil. A vitamina B2 apresenta característica de pó cristalino amarelo fotossensível, com solubilidade média em água de 13 mg/100 mL a 27ºC. Esta vitamina aparece na natureza nas formas FAD (Flavina Adenina Dinucleotídica) e FMN (Flavina mononucleotídica), presentes em vias metabólicas de hidrogenação e desidrogenação de moléculas e no transporte de elétrons para oxigênio molecular tornando-se uma vitamina importante para as funções fisiológicas humanas (MACK; GRILL, 2006). A Tabela 4 fornece um resumo das propriedades de ambas as moléculas.

A quercetina e a vitamina B2 podem ser usadas como ingredientes de alimentos do minimamente processado ao ultra processado. A Tabela 4 apresenta um resumo das propriedades de ambas as moléculas. Entretanto, ocorre a diminuição da biodisponibilidade desses bioativos em dois momentos: no processamento dos alimentos, como cozinhar e ferver, e com alterações de pH; após o consumo as condições fisiológicas podem degradá-los durante a passagem pelo trato gastrointestinal antes da absorção pelo organismo (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Assim, a nanoencapsulação apresenta-se como uma alternativa tecnológica para a indústria de alimentos para melhorar as propriedade funcionais e nutracêuticas dos alimentos ou ainda para tornar o alimento um nutracêutico (AKBARI-ALAVIJEH; SHADDEL; JAFARI, 2020). Além da proteção, as nanocápsulas aliviam a incompatibilidade, aumentam a solubilidade, melhoram o mascaramento do sabor e do odor e são capazes de liberar o bioativo em regiões específicas e de forma controlada (KHARE; VASISHT, 2014).

De acordo com KHARE e VASISHT (2014) o uso de sistema de nanoencapsulação é pouco presente na indústria de alimentos devido ao alto custo. O que torna necessário mais estudos na área para barateamento do processo de nanoestruturação e encapsulação de bioativos, tornando a tecnologia cada vez mais viável,

Tabela 4. Resumo das propriedades e das aplicações de quercetina e vitamina B2.

Propriedade	Quercetina	Vitamina B2
Fórmula	$C_{15}H_{10}O_7$	$C_{17}H_{20}N_4O_6$
Massa Molar	302,236 $g \cdot mol^{-1}$	376,36 $g \cdot mol^{-1}$
Ponto de Fusão	317 °C	280 °C
Característica	Pó cristalino amarelado	Pó cristalino amarelo
Armazenamento	Refrigerado	Refrigerado e na ausência de luz (fotossensível)
Afinidade	Hidrofóbico (Solúvel em álcool)	Hidrofílico
Solubilidade em água (25°C)	insolúvel	0,13 $g \cdot L^{-1}$
Fonte	Frutas e vegetais	Vegetais, ovos, carnes e leite

Funcionalidade	Quelante de metais e radicais livres	Cofator em funções fisiológicas
Benefícios	Proteger os sistemas cardiovascular, renal e hepático; anticancerígeno.	Regulação fisiológica

3.8. Indústria de laticínios: Queijo Minas Frescal

Os queijos datam de 8 mil anos, aparecem em textos antigos gregos, romanos, na bíblia. Os registros referem-se à primeira revolução da agricultura que ocorreu na crescente fértil região onde hoje é o oriente médio, entre os rios Tigre e Eufrates junto com a formação das primeiras civilizações (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a; PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013).

O surgimento de diferentes tipos de queijos ao longo da história foi consequência de dois fatores: o primeiro as características do leite de cada região, devido ao clima, a espécie de animal de origem, a nutrição animal e a microbiota endógena; o segundo da necessidade de armazenamento provocando maiores períodos de maturação e ação de fungos (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013).

A cultura de consumo de queijos transcende as nacionalidades antigas, é hábito do oriente ao ocidente e se estende até os dias atuais, com técnicas de produção cada vez mais modernas. Entre os mais de 2000 nomes e tipos diferentes de queijos os que mais se destacam em aspectos produtivos são cheddar, suíço, irlandês e muçarela (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a).

A Associação Brasileira das indústrias de Queijo (Abiq) estima que a média de consumo per capita do brasileiro é de 5,4 kg anuais. Pela Portaria Normativa nº 146, de 07 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA) define queijo como*:" produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes"*. A Tabela 5 mostra a classificação dos queijos quanto a umidade e gordura de acordo com a mesma instrução normativa.

Tabela 5. Classificação dos queijos quanto a umidade e teor de gordura.

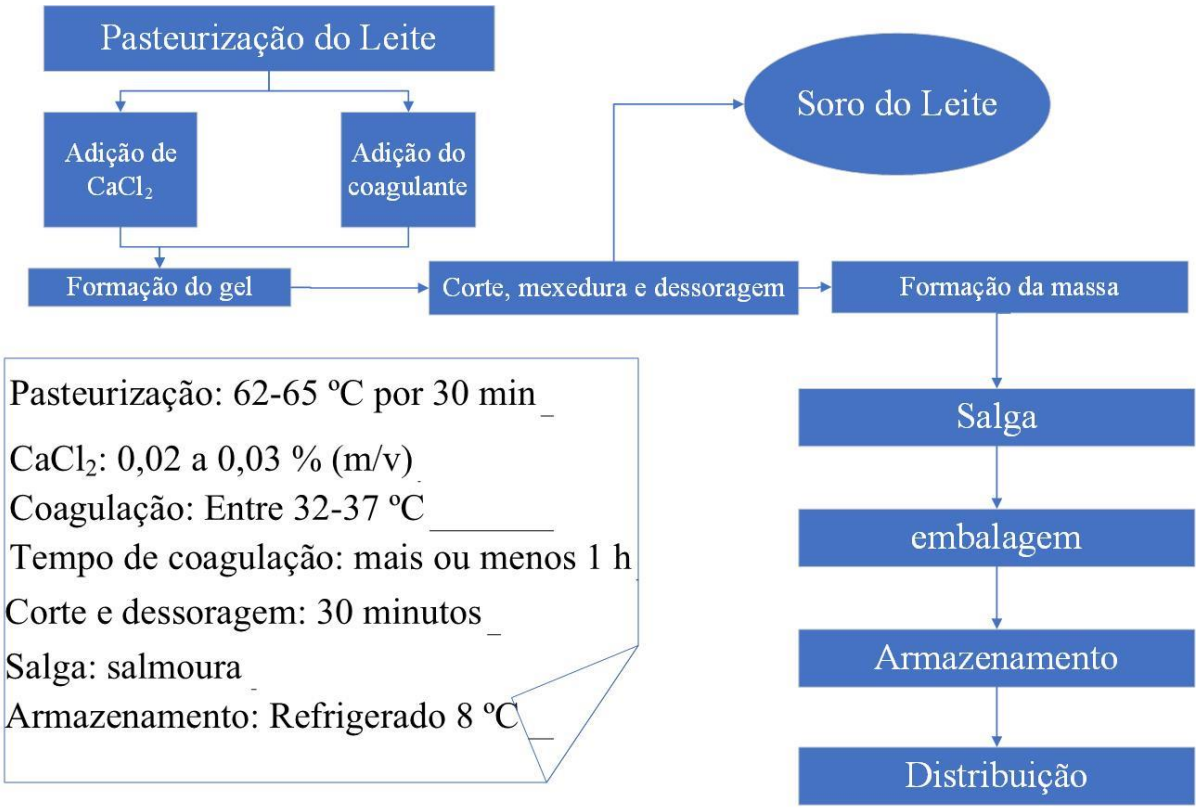
Quanto ao teor de gordura em matéria seca		**Quanto a umidade**	
Extra gordo ou creme	Mínimo 60%	Baixa	Até 35,9%
Gordo	45 a 59,9%	Média	36 a 45,9%
Semi gordo	25 a 44,9%	Alta	46 a 54,9%
Magros	10 a 24,9%	Muito Alta	Acima de 55%
Desnatados	Até 10%		

Adaptado: Portaria MAPA nº 146 de 07/03/1996

Dentre os tipos de queijo existentes, há o queijo fresco, aquele que logo após a fabricação já está pronto para consumo, ou seja, não há a necessidade de passarem pelo processo de maturação que pode levar dias, semanas ou meses (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013). O queijo *Minas Frescal* é um queijo fresco de produção simples via coagulação enzimática do leite bovino, fabricado em escala industrial e artesanal, sendo muito popular no Brasil, principalmente, no estado de Minas Gerais. Este é um queijo que apresenta coloração branca, acidez leve, sabor suave e massa não compactada com certos orifícios, o teor de sal varia entre 1,4 e 1,6% (m/m), um queijo de alta umidade (> 55 %) e pH próximo da neutralidade ou levemente acidificado (DAGOSTIN; CARPINE; MASSON, 2013).

O protocolo base da produção de queijo *Minas Frescal* está descrito pela EMBRAPA (SILVA, 2005). Basicamente, sua produção pode ser dividida em pasteurização e padronização do leite, coagulação, corte e dessoragem, enformagem e armazenamento (Figura 4).

Figura 4. Esquematização genérica da produção de queijo *minas frescal*.



Fonte: Autor.

Primeiro, o leite deve ser pasteurizado para a remoção de microrganismos contaminantes e então padronizado. Para aumentar a concentração de cálcio solúvel no leite perdido durante a pasteurização é adicionado $CaCl_2$ 0,02 a 0,03% (m/v). Em seguida, é adicionado o coagulante, em quantidade normalmente indicado pelo fabricante, com a função de promover a coagulação enzimática e formação do gel do queijo. No caso do queijo frescal é utilizado a enzima quimosina, o leite deve estar entre 30 e 36 ºC e deve ser mantido em repouso aproximadamente 1 h. O excesso de coagulante causa sabor amargo ao queijo. Após a coagulação, são feitos cortes na horizontal e na vertical formando cubos com arestas regulares. Em seguida, agita-se por 1 min seguido de repouso por 3 min, durante 30 min; esse é o processo de mexedura, seguida pela remoção do soro ou dessoragem. Por fim, os queijos são enformados e deve-se virar o queijo duas vezes para a remoção completa do soro. Nesse momento, faz-se a salga da superfície com salmoura e o queijo está pronto, devendo ser armazenado sobre refrigeração (SILVA, 2005).

A salga desempenha papel importante na fabricação do queijo atuando no controle osmótico, na sinérese do soro, regulação da atividade enzimática, umidade e na preservação. O sal também desempenha papel nas características sensoriais, pois mascara o sabor lático e odores estranhos

da massa crua de caseína. O sal NaCl pode ser adicionado à massa do queijo na etapa final do processo utilizando salmoura ou sal sólido, ou pode ser adicionado no leite antes da coagulação (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a; PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013).

É importante ressaltar que a pasteurização do leite pode inativar enzimas que contribuem para manter a qualidade do produto. Portanto, é comum a adição de acidificantes, para regular o pH, e de $CaCl_2$ afim de deixar o meio adequado para a ação enzimática (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a). A ação enzimática da renina hidrolisa a caseína presente no leite em uma massa, ou gel, na presença de Ca^{2+} a temperatura acima de 20 °C, sendo a k-caseína a responsável pela estabilização devido a interação hidrofóbica da porção N-terminal, enquanto a porção C-terminal interage com o meio aquoso. A enzima quebra a ligação Phe_{105}-Met_{106} e o Ca^{2+} provoca a união das micelas (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a).

A literatura também traz outras formas de produção de queijo com aditivos alimentares. A eficácia dos aditivos é também inferida quando as propriedades físico-químicas e de textura dos queijos não são alteradas e os padrões de qualidade e aceitação do consumidor são mantidos. De modo geral, existem diversas alternativas na fabricação de queijos probióticos e nutracêuticos sem a perda de qualidades básicas dos produtos utilizando a nanotecnologia, ácidos orgânicos e microrganismos(KARIMI; AMIR MOHAMMAD; ADRIANO GOMES DA, 2011). A Tabela 6 compara o que diferentes autores trazem em relação aos aditivos químicos ou biológicos, adicionados aos queijos minas frescal.

Tabela 6. Apresentação de diferentes trabalhos que utilizaram aditivos para a manufatura de queijo minas frescal, e a conclusão dos autores.

Autor	Aditivos	Resultado
DANTAS; JESUS; SILVA; ALMADA *et al.* (2016)	Ácido lático, *Lactobacillus casei Zhang*	Poucas alterações, podendo ser um produto probiótico.
MALHEIROS; SANT'ANNA; BARBOSA; BRANDELLI *et al.* (2012)	Nisina e BLS P34 (livre e encapsulada)	Sem alterações nas propriedades, seno o encapsulado um agente de controle microbiológico

FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO e PRUDÊNCIO (2010)	ácido láctico e *Bifidumbactería* Bb-12	Sem alterações nas propriedades, sendo uma alternativa na acidificação
SPERRY; SILVA; BALTHAZAR; ESMERINO *et al.* (2018)	*Lactococcus Lactis ssp. lactis; Lactococcus lactis ssp. cremosis; lactobacillus casei 01*	Provocou alterações nas propriedades físico-químicas e provocou alterações moleculares nos queijos.
DAGOSTIN; CARPINE e MASSON (2013)	Diferentes acidificações, ácido lático e CO_2	Apresentou diferenciações nas propriedades físico-químicas

Nota-se que a literatura reporta o uso de variados aditivos para a melhora de queijo minas frescal, porém o uso de nanotecnologia e de nanoproteínas é incipiente. Portanto, a utilização de nanoproteínas em queijos e outros produtos lácteos é uma área de pesquisa e desenvolvimento ainda pouco explorada pela academia e pela indústria.

4. Material e Métodos

4.1. Material

A proteína α-lactoalbumina (α-la; 95 % de proteína, sendo 90 % α-la) foi gentilmente cedida pela Davisco Food International, Inc. (Eden Prairie, MN, EUA). A quercetina e a vitamina B2 foram compradas da Sigma Aldrich (San Luis, MO, EUA). O leite pasteurizado e o coagulante HA-LA foram comprados em comércio local. Os demais reagentes utilizados são de grau PA sem purificação prévia. Foi utilizada água destilada purificada via osmose reversa (Hidrotek, Portugal).

4.2. Obtenção de nanoestrutura de α-lactoalbumina pura

A obtenção de α-lactoalbumina nanoestruturada pura (nano α-la pura) seguiu a metodologia proposta pelo grupo de pesquisa Nanotec da Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ) em trabalhos não publicados. Foi preparado uma dispersão de α-lactoalbumina 2,00 $mg \cdot mL^{-1}$ em solução de NaCl 10 $mmol \cdot L^{-1}$, a 25 ºC, essa dispersão foi agitada em agitador a 160 rpm (Incubator Shaker Series 126, New Brunswick) durante 10 min.
A dispersão de α-lactoalbumina nativa pura (α-la pura) 2,00 $mg \cdot mL^{-1}$ foi preparada em solução NaCl 10 $mmol \cdot L^{-1}$, a 25 ºC, sem agitação. Ambas as amostras foram armazenadas sobre refrigeração a 4 ºC.

4.3. Caracterização de α-lactoalbumina nanoestruturada

4.3.1. Determinação do tamanho e da polidispersão da nanoestrutura

O NanoZeta sizer (Malvern, Inglaterra) foi utilizado para a determinação do raio de hidrodinâmico (nm), potencial zeta e do índice de polidispersão (PDI) das α-lactoalbumina nanoestruturada pura. As medidas foram realizadas utilizando 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=632,8 nm, linearmente polarizada. Para controle de intensidade foi empregado um sistema de polarizadores cruzados. As amostras foram analisadas sem purificação adicional.

4.3.2. Estabilidade de tamanho e microbiológica da nano α-lactoalbumina pura

A estabilidade do tamanho da nano α-la pura (2,00 mg·mL^{-1}) a 4 ºC foi avaliada medindo o raio hidrodinâmico (nm), PDI e potencial zeta (mV) (seção 4.2.1) nos dias 0, 5, 10, 15 e 30.
A estabilidade microbiológica da nano α-la pura e α-la nativa pura foi avaliada em placas para cultura microbiológica. As dispersões de α-la (2,00 mg·mL^{-1}) foram preparadas em água destilada esterilizada e armazenadas a 4 ºC. Um volume de 60,0 µL de solução proteica foi pipetada em placas de Petri contendo meio Müller-Hinton (MH) para avaliar crescimento bacteriano e em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA) para avaliar crescimento fúngico. Os experimentos foram conduzidos nos dias 0, 5, 10, 15 e 30 e feitos em triplicata. As placas MH foram incubadas a 37 ºC por 24 h e as placas BDA foram incubadas a 30 °C por 10 dias. O crescimento de colônias nas placas foi então avaliado.

4.3.3. Análise térmica de α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada pura

Um analisador termogravimétrico (Shimadzu modelo DTG60, Japão) e calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu modelo DSC-60 Plus, Japão) foi utilizado para monitoramento das propriedades térmicas da nano α-la pura e α-la nativa pura. A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com uma amostra em um cadinho de alumina, aquecida de 25 a 300 °C à uma taxa de aquecimento de 10 °C·min^{-1}, sob um fluxo de nitrogênio de 50,0 mL·min^{-1}. Mudanças na massa em função da temperatura foram registradas. As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas com uma amostra em cadinho de alumínio fechado por crimpagem, sob as mesmas condições das análises termogravimétricas.

4.3.4. Análise do tamanho e morfologia da nano α-la pura via Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM, Campinas, Brasil), utilizando o microscópio MET JEOL 1400 PLUS (120 kV), com filamento de Hexaboreto de lantânio (LaB_6), equipada 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 mA por 10 s com o objetivo de melhorar a molhabilidade delas. Posteriormente, uma gota da suspensão produzida de nanoestrutura de proteína a 2 mg·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 a 25 ºC até secagem e armazenada para posterior análise.
O tamanho das nanoproteínas nas imagens foram medidos no software Image J.

4.4. Atividade antimicrobiana da α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada pura

A bactéria analisada foi a *Listeria monocytogenes* MCTC 10059 que foi ativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia), incubadas a 37 ºC por 24 h.
A avaliação antimicrobiana foi realizada com microplaca de 96 poços no leitor de microplaca (Synergy HT, Biotek, Highland Prk USA) com 51 leituras a 625 nm, em intervalos de 1 h, a 37 ºC. Em cada poço foi adicionado 200,0 µL sendo: 115,0 µL de caldo BHI, 10,0 µL da bactéria, água destilada e a dispersão de α-la nanoestruturada com variação do volume para atingir as concentrações de proteína desejada de 0,00012 a 0,75 $mg \cdot mL^{-1}$. O controle negativo foi feito sem a adição da dispersão de proteínas. Repetiu-se o experimento utilizando α-la nativa. O controle negativo foi realizado sem a adição da dispersão proteica. Como branco foram utilizadas as análises sem a adição da bactéria descontando os valores da absorbância.

4.5. Estabilidade da Espuma

O aumento e estabilidade da espuma foram estudados para a α-lactoalbumina nanoestruturada pura e α-lactoalbumina nativa pura. Foi mensurado o volume inicial das amostras, em seguida estas foram homogeneizadas por 1 min a 13500 rpm (Ultraturrax T25, IKA, Alemanha). O volume total da espuma foi mensurado e o aumento do volume da espuma foi calculado conforme a equação 1.

$$VI(\%) = 100 \cdot \frac{V_T - \frac{V_T}{V_F}}{V_T} \qquad (1)$$

Onde VI(%) é o aumento do volume; V_T é o volume total da suspensão mais a espuma após homogeneização; e V_F é o volume da espuma.

A estabilidade da espuma (FS) foi calculado conforme equação 2. Após a homogeneização o volume da espuma foi mensurado em intervalos de 5 min por 120 min ou até observar que o volume era zero.

$$FS\ (\%) = 100 \cdot \frac{V_{Ft}}{V_{FtO}} \quad (2)$$

Onde, V_{Ft} é o volume da espuma no tempo t e V_{Ft0} é o volume da espuma no tempo zero.

4.6. Estabilidade da Emulsão

O estudo da emulsão foi adaptado da metodologia proposta por PEARCE e KINSELLA (1978). Foram preparadas emulsão óleo em água na proporção 3:1 de óleo de girassol e a dispersão proteica: α-lactoalbumina nanoestruturada pura e nativa pura. A emulsão foi homogeneizada a 13500 rpm (Ultraturrax T25, IKA, Alemanha) por 1 min. Então, alíquotas de 100 µL foram retiradas do fundo do frasco e diluídas em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1 % (m/v) em intervalos regulares de (0, 5, 15 e 30 min). As soluções foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis (IL-592 IONLAB, Paraná Brasil) a 500 nm para os cálculos do índice de estabilidade de emulsão (ESI) e o índice de atividade da emulsão (IAE) com descrito nas equações 3 e 4, respectivamente.

$$ESI\ (min) = \frac{A_0}{A_0 - A_t} \cdot t \quad (3)$$

$$IEA\ (m^2 \cdot g^{-1}) = \frac{2 \cdot 2{,}303 \cdot A_0 \cdot DF}{C \cdot (1-\theta) \cdot 1000} \quad (4)$$

Onde A_0 é a absorbância no tempo zero, A_t é a absorbância no tempo de retirada da alíquota exceto no tempo zero, t é o tempo, c é a concentração inicial de proteína ($mg \cdot mL^{-1}$) e θ é a fração do óleo para formar emulsão (0,25).

4.7. Encapsulação de quercetina e vitamina B2 em α-lactoalbumina nanoestruturada e nativa

As encapsulações de Quercetina e Vitamina B2 em nanoproteínas foram realizadas separadamente. Preparou-se uma solução de Vitamina B2 0,30 $mg \cdot mL^{-1}$ em meio aquoso e de Quercetina 1,00 $mg \cdot mL^{-1}$ em etanol 98% (v/v).

Os microtubos (1,5 mL) devidamente secos foram pesados em balança analítica de 6 casas decimais (Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA) e em cada microtubo foi adicionado 1000.0 µL de α-lactoalbumina nanoestruturada 2,00 $mg \cdot mL^{-1}$. A Vitamina B2 e a Quercetina foram

adicionadas em diversos volumes para obter as concentrações finais conforme descrito na Tabela 7. O experimento também foi realizado com a α-la nativa em solução salina 10 mmol·L^{-1}.

Tabela 7. Esquematização dos sistemas e das concentrações finais de Quercetina e de Vitamina B2 no teste de encapsulamento com α-lactoalbumina nativa e nanoestruturada.

Sistema	[Vitamina B2] (mmol.mL^{-1}).10^5	[Quercetina] (mmol.mL^{-1}).10^5
1	4,00	8,25
2	8,00	16,50
3	16,00	33,00
4	20,00	50,00
5	24,00	100,00
6	32,00	200,00
7	40,00	300,00

As amostras foram agitadas manualmente por 5 min e centrifugadas a 20 ºC e 16,787 g por 30 min (Centrífuga 5920R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro UV-Vis (IL-592 IONLAB, Paraná Brasil) a 373 nm (Quercetina) e 445 nm (Vitamina B2) para obtenção da eficiência da encapsulação EE (%) pela Equação 5. O pellet ficou em estufa a 50 °C por 48 h para secagem e posterior pesagem.

Pela subtração da massa de cada microtubo o valor de Wnp foi obtido na Equação 6. Então, o valor da capacidade de ligação (LC) dos bioativos na nanoestrutura foi calculado pela equação 6.

$$EE(\%) = (W_{total} - W_{livre}) \cdot \frac{100}{W_{total}} \quad (5)$$

$$LC(\%) = (W_{total} - W_{livre}) \cdot \frac{100}{W_{np}} \quad (6)$$

Repetiu-se o experimento para a α-la nativa dispersa em NaCl 10 mmol·L^{-1}.

Os bioativos encapsulados em nano α-la pura que apresentaram maiores valores de %EE e %LC, foram caracterizadas quanto ao raio hidrodinâmico, PDI e potencial zeta seguindo metodologia descrito no item 4.3.1 e foi determina a estabilidade térmica seguindo metodologia do item 4.3.3.

4.8. Liberação Controlada *in* vitro simulando fluido gastrointestinal

A liberação controlada dos bioativos seguiu metodologia de ADITYA; MACEDO; DOKTOROVOVA; SOUTO *et al.* (2014) com adaptações. Os bioativos encapsulados na α-la nanoestruturada e nativa conforme as concentrações que apresentaram os melhores resultados de eficiência de encapsulação (EE%) e capacidade de ligação (LC%) foram utilizados nos ensaios de liberação controlada *in vitro* simulando fluido gástrico e fluido intestinal. Dispersões de 2,00 $mg \cdot mL^{-1}$ de encapsulados foram preparados.

Para o sistema com a nano α-la, os resultados foram: Concentração de quercetina $300{,}0 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot L^{-1}$ (98,49 ± 0,28 % EE e 74,33 ± 1,22 % LC); concentração de vitamina B2 $24{,}0 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot L^{-1}$ (69,31 ± 0,68 % EE e 13,08 ± 0,17 % LC). No sistema com α-la nativa os resultados foram: concentração de quercetina $100{,}0 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot L^{-1}$ (84,71 ± 2,27 % EE e 28,97 ± 5,96 % LC) e concentração de vitamina B2 $8{,}0 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot L^{-1}$ (77,74 ± 1,92 % EE e 19,25 ± 1,14 % LC).

As dispersões foram colocadas em ambiente simulando fluido gástrico (FG), acidificado com HCl até pH 1,2 com pepsina 0,1 % (m/v) e sem pepsina. Esse sistema foi mantido a 37 ºC por 2 h. Alíquotas eram retiradas a cada 30 min 16.787 g e lidas em espectrofotômetro a 373 nm para quercetina e 445 nm para a vitamina B2.

Após 2h esse sistema foi centrifugado a 20133 g por 30 min (Centrífuga 5920R, Eppendorf, Alemanha). O pellet foi suspendido em solução tampão fosfato 0,10 $mol \cdot L^{-1}$ pH 7,4, simulando fluido intestinal (FI) com pancreatina 1 % (m/v) e sem a pancreatina. Esse sistema ficou a 37 ºC por 1 h e a cada 30 min foram retiradas alíquotas para leitura no espectrofotômetro a 373 nm para quercetina e 445 nm para a vitamina B2.

Todos os testes foram feitos em triplicata. A porcentagem da liberação (RC) de cada bioativo foi calculada pela equação 7.

$$RC\ (\%) = \frac{Concentração\ no\ tempo\ t}{Concentração\ inicial} \qquad (7)$$

4.9. Produção de Queijo Minas Frescal

Para produção de queijo minas tipo frescal, 500 mL de leite pasteurizado (Laticínio Santa Efigênia), adquiridos em comercio local, foi mantido em banho-maria até atingir a temperatura de 32 ºC. O volume de 250 µL de $CaCl_2$ 0,50 $g \cdot mL^{-1}$ foi adicionado ao leite, e as quantidades de NaCl, KCl e α-la nanoestruturada pura foram incorporadas conforme delineamento experimental. Um volume de 4,15 mL de coagulante foi adicionado à mistura quando a

temperatura atingiu 32 ºC (enzima quimiosina microbiológica de *Aspergillus Niger* var. awamori; poder coagulante: 1:3000/ 75 IMCU, HA-LA, Brasil).

Após o tempo de formação do gel de aproximadamente 1 h, cortes horizontais e verticais formando quadrado de 2 cm de aresta foram realizados. Em seguida, o sistema foi agitado por 1 min e repousado por 3 min até completar 30 min. Então, a massa foi enformada. A cada 30 min os queijos eram virados para a remoção do soro por 1 h; os queijos foram armazenados a 4 ºC para posteriores análises.

Após 4 dias de descanso em geladeira a 4 ºC os queijos foram ralados para as análises físico-químicas; os queijos foram mantidos inteiros para as análises de perfil de textura.

Foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) para a produção de queijo, variando as concentrações de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) e α-lactoalbumina nanoestruturada pura (nano α-la pura). A Tabela 8 mostra a matriz codificada e de valores reais do delineamento, sendo ao todo 17 experimentos com 3 variações no ponto central. As massas de NaCl e KCl variaram de 0 a 12,5 g e o volume de nano α-la (2 $mg \cdot mL^{-1}$) variou de 83 a 292 µL.

Repetiu-se os ensaios de 1 a 9, porém, sem adicionar as nanoproteínas, como controle, para as análises físico-químicas e de textura.

Tabela 8. Valores codificados e valores reais pelo DCCR para a matriz experimental de produção de queijo padrão, tendo como variáveis independentes a quantidade de NaCl, KCl e α-lactoalbumina nanoestruturada pura.

Ensaio	NaCl (g)	KCl (g)	Nano α-la pura (µL)
1	-1,0000 (2,5)	-1,0000 (2,5)	-1,0000 (125)
2	-1,0000 (2,5)	1,0000 (10)	1,0000 (250)
3	1,0000 (10)	-1,0000 (2,5)	1,0000 (250)
4	1,0000 (10)	1,0000 (10)	-1,0000 (125)
5	0,0000 (6,25)	0,0000 (6,25)	0,0000 (187,5)
6	-1,0000 (2,5)	-1,0000 (2,5)	1,0000 (250)
7	-1,0000 (2,5)	1,0000 (10)	-1,0000 (125)
8	1,0000 (10)	-1,0000 (2,5)	-1,0000 (125)
9	1,0000 (10)	1,0000 (10)	1,0000 (250)
10	0,0000 (6,25)	0,0000 (6,25)	0,0000 (187,5)

11	-1,67332 (0)	0,0000 (6,25)	0,0000 (187,5)
12	1,67332 (12,5)	0,0000 (6,25)	0,0000 (187,5)
13	0,0000 (6,25)	-1,67332 (0)	0,0000 (187,5)
14	0,0000 (6,25)	1,67332 (12,5)	0,0000 (187,5)
15	0,0000 (6,25)	0,0000 (6,25)	-1,67332 (83)
16	0,0000 (6,25)	0,0000 (6,25)	1,67332 (292)
17	0,0000 (6,25)	0,0000 (6,25)	0,0000 (187,5)

4.9.1. Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas foram adaptadas de MCSWEENEY e FOX (1993) Amostras de 1 g foram adicionadas em 10 mL de etanol 98% (v/v) durante 6 h. As amostras foram tituladas com NaOH 0,1 mol·L^{-1} tendo fenolftaleína 1% (m/v) como indicador. A acidez titulável (AT) foi calculada pela Equação 8 e representa a quantidade de ácido lático presente no queijo.

$$AT = \frac{Vxfx0{,}9}{m} \qquad (8)$$

Onde V é o volume em mL de NaOH 0,10 mol·L^{-1} utilizado, f é o fator de correção da solução de NaOH preparada e m é a massa de amostra utilizada na titulação.

Para determinar os conteúdos de sólidos solúveis, pH e condutividade elétrica foi preparado um extrato com 5,00 g de queijo e 50,0 mL de água destilada. Deste extrato, os sólidos solúveis foram quantificados em um refratômetro portátil (RTA-50, Instrutherm, Brasil), o pH em um pHmetro digital (pHmetro DM-22, Digimed, Brasil) e a condutividade elétrica em um condutivímetro (MS Tecnopon, Brasil).

4.9.2. Análise de Perfil de Textura (TPA) de queijo

O teste de dupla compressão no queijo foi aplicado até 50% da altura inicial da amostra, a uma velocidade de 2 mm·s^{-1}, a 25ºC, utilizando Texturômetro (TA.XT Plus, Texture Analyser, Stable Micro System, Surrey, Reino Unido), contendo um sensor cilíndrico de 10,0 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura (P100), para avaliar os parâmetros de coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade, resiliência e dureza.

4.10. Queijos com bioativos nano encapsulados

Com os resultados da encapsulação foi escolhido a concentração de bioativo em nano α-la 2,00 $mg \cdot mL^{-1}$ que apresentaram maiores valores de EE% e LC% para substituir a nano α-la pura na produção de queijo *minas frescal*. Os queijos produzidos seguiram metodologia escolhidas a partir do ponto ótimo do planejamento experimental. Repetiu-se os experimentos descritos nos itens 4.9.1 e 4.9.2 para queijos com nano α-la + quercetina (QQ) e queijos com nano α-la + vitamina B2 (QV).

4.11. Análises Estatísticas

Os tratamentos estatísticos de ANOVA com 95 % de significância, gráfico de Pareto ($p = 0,05$) e teste de tukey ($p < 0,05$) e a elaboração de gráficos foram realizadas no Excel 2016.

5. Resultados e Discussão

5.1. Obtenção e caracterização da α-lactoalbumina nanoestruturada pura

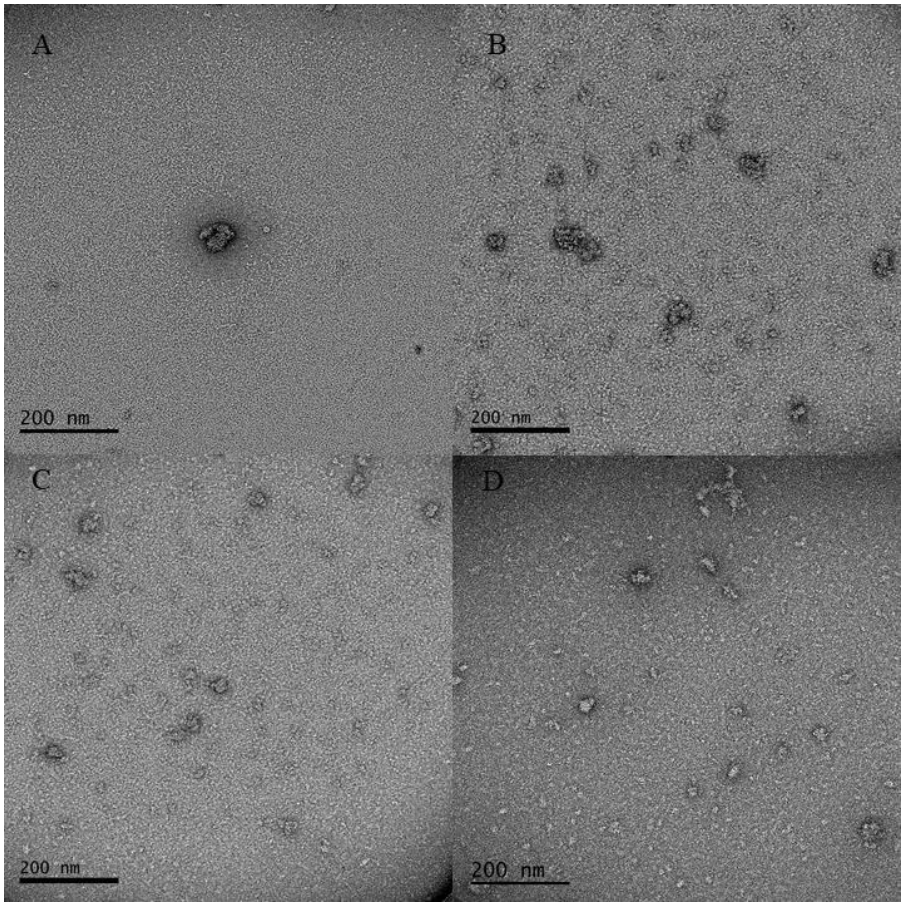
O raio hidrodinâmico da nano α-la pura foi de 191,10 ± 21,33 nm; o critério estabelecido para considerar que o tamanho estava na faixa nanométrica foi obter tamanho de no máximo 300 nm (USKOKOVIĆ, 2007). A metodologia foi eficiente para obtenção de nanoestraturas de α-la por rearranjo dos monômeros alterando a força iônica do meio. As proteínas nativas quando submetidas a estresse do ambiente (pH, solvente, força iônica e temperatura) sofrem modificações estruturais e buscam estágios termodinâmicos mais favoráveis com isso se agregam formando estrutras terciárias maiores do que a forma nativa (IPSEN; OTTE, 2007; O'REGAN; ENNIS; MULVIHILL, 2009).

ARROYO-MAYA; RODILES-LÓPEZ; CORNEJO-MAZÓN; GUTIÉRREZ-LÓPEZ *et al.* (2012) utilizaram três solventes orgânicos como agentes de dessolvatação para obtenção de nanoestruturas de α-la e estabeleceram a acetona como melhor solvente e encontraram tamanho para nano α-la de 152,3 nm mensurado pelo DLS. TARHAN; TARHAN e HARSA (2014) sintetizaram nanotubo de α-la com tamanhos de 20 a 100 nm ao solubilizar a proteína nativa em tampão Tris-HCl 75 $mmol \cdot L^{-1}$ em pH 7,5 na presença de $CaCl_2$ na proporção 2:1 e 4 % (m/m) de BLP e incubá-las a 50 °C. O índice de polidispersividade (PDI) de 0,359 ± 0,059 indica populações dispersas. O critério para ser considerado uma boa dispersão é de que o PDI tenha valor preferêncialmente abaixo de 0,4 (MADALENA; RAMOS; PEREIRA; BOURBON *et al.*, 2016), os resultados deste trabalho estão nesse limite.

O potencial zeta mensurado foi de - 7,71 ± 0,14 mV, portanto, a dispersão de nano α-la não é eletrostaticamente estável no solvente utilizado nesse trabalho. Sistemas coloidais estáveis devem apresentar potencial zeta menores que -30 ou maiores +30 mV (MOORE; CERASOLI, 2010). Para conferir estabilidade do sistema coloidal proteico pode-se adicionar um agente estabilizante ou regular o pH acima do ponto isoelétrico da proteína (4,2). De acordo com ARROYO-MAYA; RODILES-LÓPEZ; CORNEJO-MAZÓN; GUTIÉRREZ-LÓPEZ *et al.* (2012) em estudos relacionando o potencial zeta e o pH da nano α-la no pI de 3,6 as nano α-la ficaram estáveis (-30 mV) em pH 4,8 utilizando acetona como agente de dessolvatação e sem tratamentos prévios da proteína.

A Figura 5 (A-D) mostra a imagem da microscopia eletronica de transmissão da amostra de nano α-lactoalbumina. Pelo software ImageJ, o tamanho médio mensurado das nanoproteínas presentes na Figura 8 é de 16,98 ± 2,14 nm. É possível observar, que não ocorreu a formação de agregados e também que a nanoestrutura obtida apresenta a forma esférica, provavelmente pelo fato da força iônica do meio ser baixa, o que não favorece a nucleação, alterando as formas de organização dos monômeros proteicos (NIGEN; CROGUENNEC; BOUHALLAB, 2009). Quando na presença de Ca^{2+} os monômeros proteicos atraídos pela carga conseguem se rearranjarem em torno do íon que serve como núcleo, , com isso a formação de nanoestrutura de α-la em formato ciclindrico é favorecida (IPSEN; OTTE, 2007).

Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão das nanoproteínas α-lactoalbumina obtida por auto-organização em solução NaCl 10 mmol·L^{-1} a 160 rpm e temperatura ambiente.



A diferença de tamanho da nanoestrutura encontrada por análise em DLS e MET é devido ao fato da primeira técnica medir o raio hidrodinâmico e a segunda o tamanho da amostra seca (SOUZA; CIMINELLI; MOHALLEM, 2016). Em solução as proteínas estão dispersas sujeitas ao movimento browniano, além disso, a exposição das estruturas randômicas (grupos hidrofóbicos e sulfídrico) são solvatados pela presença de sais que mantém a solubilidade da proteína. Possivelmente as moléculas proteicas ficam mais expandidas em solução salina para garantir a interação das porções hidrofílicas com as moléculas do solvente (O'REGAN; ENNIS; MULVIHILL, 2009; VAN AKEN; MERKS, 1996). A técnica DLS mensura o raio hidrodinâmico considerando o movimento browniano, ou seja, é uma leitura de seu estado dinâmico (ALEXANDER; DALGLEISH, 2006). Ao secar a dispersão coloidal para utilização na grid do MET é possível que a proteína tenha sofrido alterações na conformação e buscado um estado mais favorável com interações moleculares das poções hidrofílicas que antes estavam interagindo com o solvente. Assim ela foi se compactando e expondo as regiões hidrofóbicas, por isso o tamanho calculado pelo MET foi menor do que o do DLS.

Estudos feitos por NIGEN; CROGUENNEC e BOUHALLAB (2009), combinaram a α-la com lisosima e obtiveram nanoproteínas esféricas, observando a influência da força eletrostática do

meio no comportamento da nanoestruturação bottom-up. ARROYO-MAYA; RODILES-LÓPEZ; CORNEJO-MAZÓN; GUTIÉRREZ-LÓPEZ *et al.* (2012) utilizando solventes orgânicos como agentes de dessolvatação (etanol, isopropanol e acetona) obtiveram imagens de MET da nano α-la em formato esférico. IPSEN e OTTE (2007) apresenta dois mecanismos diferentes de síntese de nano α-la, a primeira forma nanotubos com diamentro de 20 nm e a segunda nanofibrilas com diametro de 5 nm. Essa formação é possivel pela nucleação promovida por ions Ca^{2+} e pela concentração de proteína acima de 30 $g \cdot L^{-1}$, a força elétrica do íons atrai as proteínas ao seu redor ordenando-as em forma de tubos (IPSEN; OTTE, 2007).

A Figura 6 (A-B) mostram as curvas de análise termogravimétrica (TGA) em porcentagem de perda de massa e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) da α-lactoalbumina nano e nativa, respectivamente. Em ambos os gráficos há um decaimento de massa na curva de TGA em uma única etapa de 25 ºC até 76,57 °C para a nano α-la e de 79,51 ºC para a proteína nativa, o que indica a decomposição da nanoproteína e a evaporação da umidade ao mesmo tempo.

DUCE; DELLA PORTA; BRAMANTI; CAMPANELLA *et al.* (2016) obtiveram a desnaturação da proteína α-la nativa em 300 ºC, com perda de massa maior que 50 %. Essa diferença da temperatura de desnaturação pode ser explicada pela natureza da amostra. Em estado sólido as interações entre as moléculas de proteína são mais fortes e, portanto é necessário uma maior energia para o rompimento. Quando em solução, as proteínas estão com interações mais fracas entre si e fazem interação com moléculas do solvente e outros íons presentes, isso altera a energia necessária para a desnaturação (RELKIN; MULVIHILL, 1996).

A análise DSC da α-la pura apresenta duas curvas endotérmicas para as duas amostras. A análise da nano α-la pura mostra que o primeiro pico endotérmico foi em 57,44 °C; representa a temperatura de desnaturação da proteína. A variação de entalpia de desnaturação da proteína nanoestruturada (ΔH) foi de 1480 $J \cdot g^{-1}$. Na análise da proteína nativa o primeiro pico endotérmico foi em 55,92 ºC com ΔH de 735,86 $J \cdot g^{-1}$.

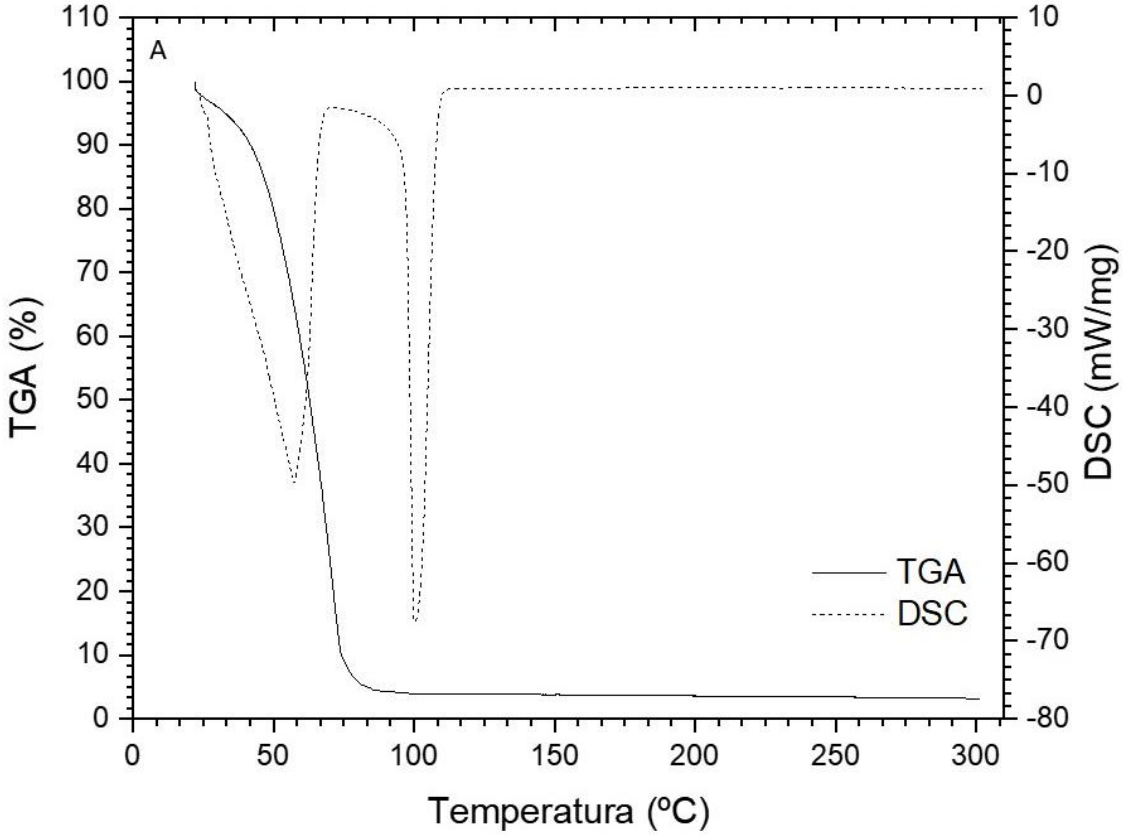
A nanoestrutração da α-la alterou a estabilidade térmica da proteína, sua forma nanoestrutruada tem maior estabilidade, sendo necessário uma quantidade maior de energia para a alteração conformacional da estrutura terciária. A estabilidade térmica da α-la varia de acordo com suas conformações quaternárias que conferem interações intramoleculares diferentes. Mudando a temperatura de desnaturação, variações de pH, força ionica e temperatura promovem alterações na conformação proteica (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015b).

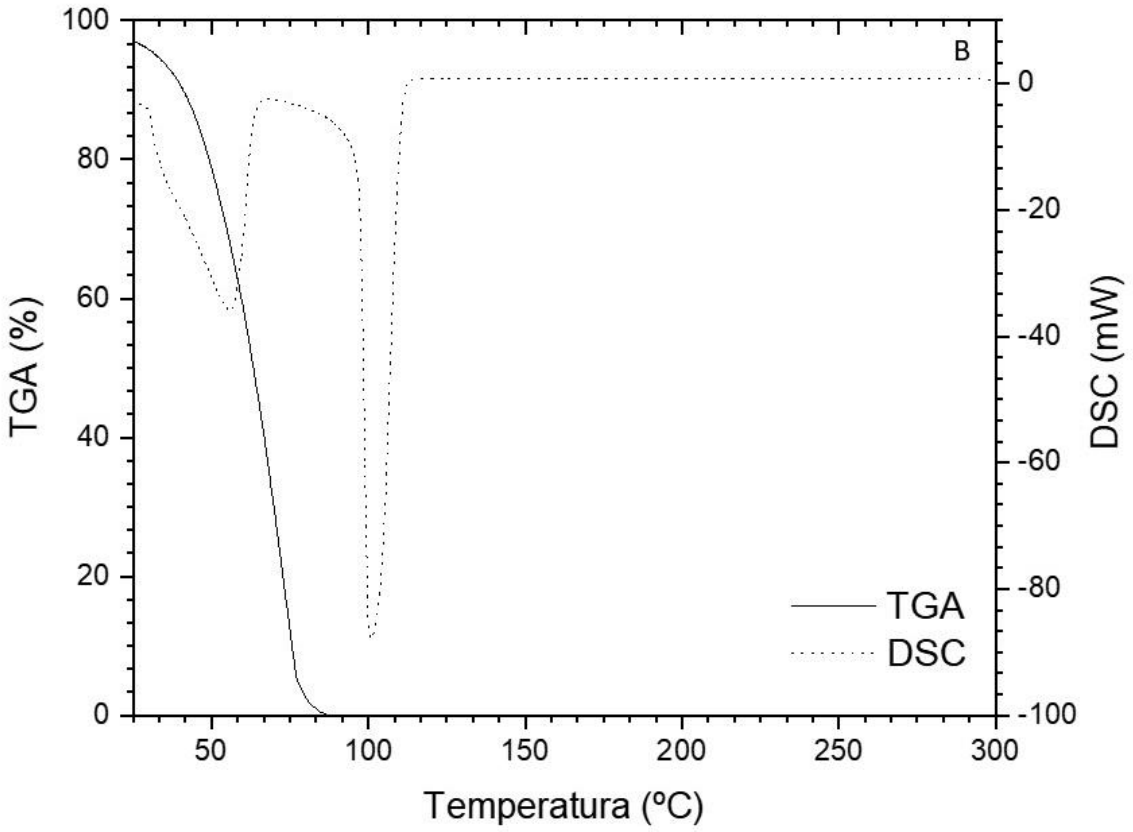
SHARMA; OEY e EVERETT (2016) observaram que a α-la nativa, obtida diretamente da centrifugação do leite, se decompôe a 57,8 ºC, e calcularam uma entalpia de 253,2 $J \cdot g^{-1}$, valores

menores do que os encontrados nesse trabalho. Essa diferença pode ser explicada pela complexidade do meio em que a proteína está presente, alterando os tipos de interações intra e intermoleculares.

A segunda curva endotérmica presente nas duas análises representa a evaporação da água (HATAKEYAMA; NAKAMURA; HATAKEYAMA, 1988) utlizada como solvente. Para a nano α-la o pico da endoterma foi de 100,37 ºC com ΔH de 483,52 $J \cdot g^{-1}$, e para a proteína nativa o pico foi em 100,74 ºC e ΔH de 620,16 $J \cdot g^{-1}$.

Figura 6. Curva da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC). A) nano α-lactoalbumina sintetizada em solução de NaCl 10,00 $mmol \cdot L^{-1}$, 25ºC e 160 rpm. B) α-lactoalbumina em solução de NaCl 10,00 $mmol \cdot L^{-1}$.





5.1.1. Estabilidade da α-lactoalbumina nanoestruturada pura em relação ao tempo

A Tabela 9 mostra o estudo da estabilidade da nano α-la. Nos dias 0 e 5 as médias do raio hidrodinâmico e do PDI foram estatisticamente semelhantes pelo teste de tukey. Em ambos, o tamanho está dentro da faixa estabelecida como nanotecnologia (até 300 nm) e populações dispersas, com PDI abaixo de 0,400 (MADALENA; RAMOS; PEREIRA; BOURBON *et al.*, 2016; USKOKOVIĆ, 2007). Após o 10º dia, as nanoproteínas se agregaram e tiveram o tamanho superior a 700 nm e PDI maior que 0,700, portanto a estabilidade do tamanho da nano α-la é estável por pelo menos 5 dias. Esse resultado é corroborado pelos valores do potencial zeta, uma vez que em todos os dias não indicaram estabilidade coloidal (menores que -30 mV ou maiores que +30 mV). Portando o sistema coloidal de nano α-la não apresentam estabilidade em solução de NaCl 10 mmol·L^{-1}.

A estabilidade microbiológica da α-la nativa e nanoestruturada não indicou crescimento de colônias de bactérias nem a presença de fungos no período de 30 dias. Portanto, a α-la nativa e nano possuem estabilidade microbiológica no período de 30 dias armazenada em geladeira. Isto está diretamente relacionado a qualidade microbiológica inicial dos reagentes utilizados e as boas práticas empregadas durante a execução dos experimentos. Esse resultado sugere que o

uso da nanoproteína em alimentos não causará alterações indesejáveis nas condições microbiológicas. Não foram encontrados na literatura estudos semelhantes sobre a estabilidade microbiológica da nano α-la.

Tabela 9. Estabilidade de tamanho (nm), PDI e Potencial Zeta (mV) das nanoproteínas α-lactoalbumina em um período de 30 dias.

Dia	Raio Hidrodinâmico (nm)	PDI	Zeta (mV)
0	191,10 ± 21,33[a]	0,359 ± 0,059[a]	-7,71 ± 0,14[a,b]
5	200,20 ± 75,84[a]	0,434 ± 0,117[a]	-11,65 ± 1,06[b]
10	793,43 ± 44,87[b]	0,707 ± 0,029[b]	-6,80 ± 2,63[a]
15	770,77 ± 12,63[b]	0,678 ± 0,028[b]	-7,48 ± 0,64[a]
30	739,70 ± 20,79[b]	0,719 ± 0,057[b]	-6,53 ± 0,33[a]

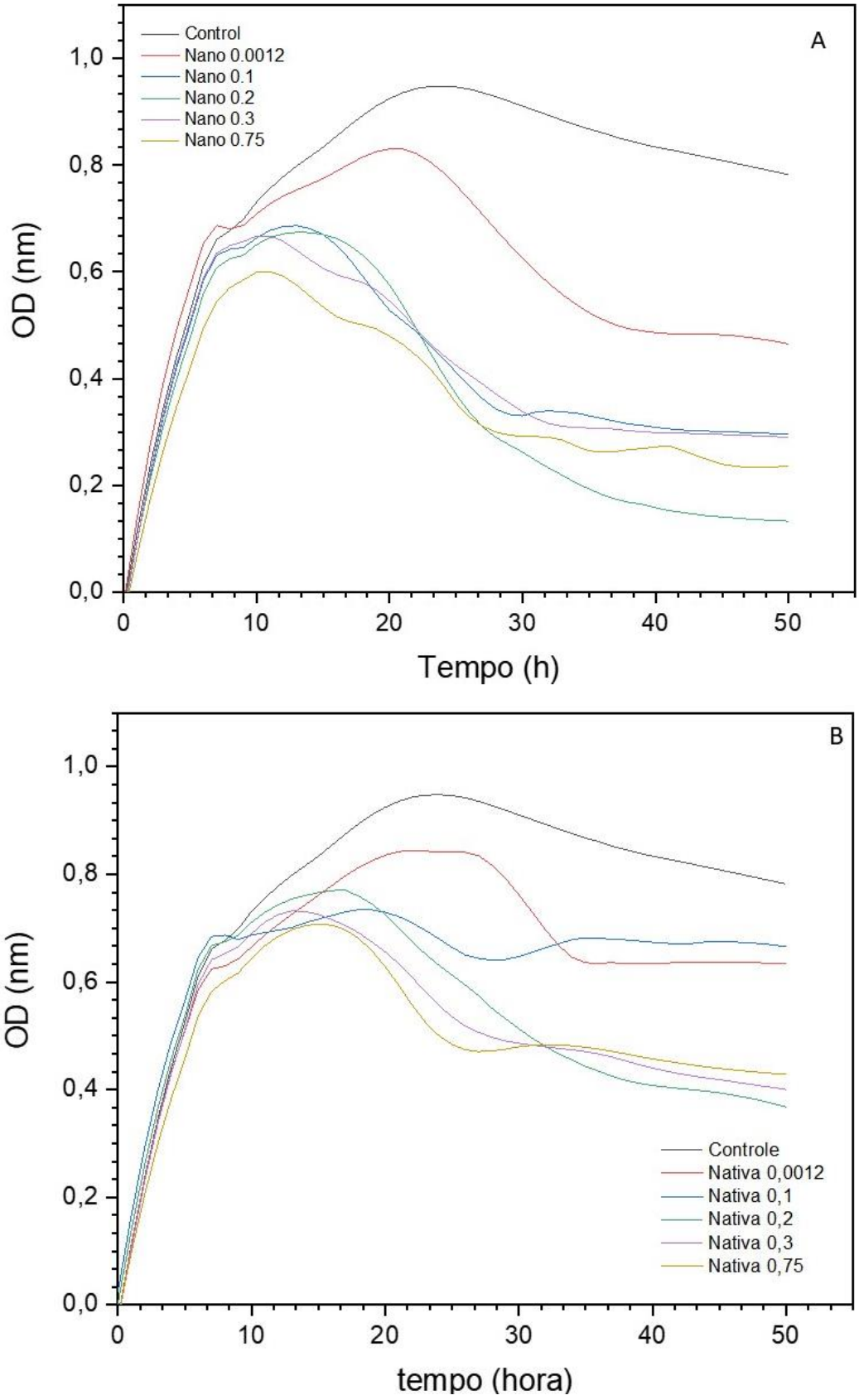
Os índices sobrescritos representam o teste de Tukey com $p < 0,05$.

5.2. Atividade antimicrobiana

A Figura 7 A e B mostram a atividade antimicrobiana da α-lactoalbumina nanoestruturada pura e nativa pura, respectivamente. A análise foi realizada com a bactéria *Listeria monocytogenes* MCTC 10059 uma bactéria que comumente contamina produtos láticos e sua presença em queijos é proibida pela legislação brasileira devido aos riscos à saúde humana.

Em ambos os casos a presença da proteína causa um efeito antimicrobiano e altera o comportamento da curva de crescimento da bactéria. Com o aumento da concentração de α-la a resposta da densidade ótica diminui. É possível observar que a proteína nanoestruturada tem efeito antimicrobiano maior do que a nativa, pois a densidade ótica de resposta para a nano α-la foi maior. Em ambos os casos, ocorreu o deslocamento da fase log comparando o controle com a presença da proteína. Com as concentrações utilizadas neste experimento não foi possível encontrar a concentração mínima inibitória (MIC).

Figura 7. Curva de crescimento microbiano de *Listeria monocytogenes* MCTC 10059 na presença de diferentes concentrações de A) nano α-la e B) α-la nativa



A Tabela 10 mostra o tempo de geração (g) calculado para cada concentração de proteína, nanoestruturada e nativa, dividindo a constante 0,301 pela inclinação da fase log de cada curva. O tempo de geração é o tempo necessário para dobrar a população celular em hora e a taxa de geração (1/g) não ficou claro o que é taxa de geração por hora (MADIGAN; MARTINKO; BENDER; BUCKLEY *et al.*, 2016).

Em ambas as amostras estudadas mesmo com o aumento da concentração de proteína as médias do tempo de geração são estatisticamente similares, como indica o teste de tukey ($p < 0,05$), ou seja, o tempo e a taxa de geração foram constantes com o aumento da concentração de proteínas. Quando comparando nano α-la com α-la nativa em todas as concentrações e no controle (sem proteína) as médias são estatisticamente semelhantes, ou seja, a nanoestruturação da α-la não alterou seu efeito antimicrobiano em *Listeria monocytogenes*.

Tabela 10. Tempo de geração (g) em horas e taxa de geração (h^{-1}) do crescimento da *Listeria monocytogenes* na presença de diferentes concentrações de α-la nanoestruturada e nativa, calculas a partir dos resultados das análises de microplaca, com o teste de tukey ($p > 0,05$).

Concentração ($mg \cdot mL^{-1}$)	α-la nanoestruturada pura		α-la nativa pura	
	Tempo de geração (h)	Taxa de geração (h^{-1})	Tempo de geração (h)	Taxa de geração (h^{-1})
Controle	$3,13 \pm 0,15^{a,b,A}$	$0,32 \pm 0,02^{a,b,A}$	$2,94 \pm 0,10^{a,A}$	$0,34 \pm 0,01^{a,A}$
0,0012	$2,90 \pm 0,41^{a,A}$	$0,35 \pm 0,05^{a,A}$	$3,26 \pm 0,40^{a,b,A}$	$0,31 \pm 0,04^{a,b,A}$
0,1	$3,09 \pm 0,15^{a,A}$	$0,32 \pm 0,02^{a,A}$	$3,13 \pm 0,10^{a,b,A}$	$0,32 \pm 0,01^{a,b,A}$
0,2	$3,84 \pm 0,25^{b,A}$	$0,26 \pm 0,02^{b,A}$	$3,65 \pm 0,19^{b,A}$	$0,27 \pm 0,01^{b,A}$
0,3	$3,11 \pm 0,10^{a,b,A}$	$0,32 \pm 0,01^{a,b,A}$	$3,10 \pm 0,26^{a,b,A}$	$0,32 \pm 0,03^{a,b,A}$
0,75	$3,12 \pm 0,38^{a,b,A}$	$0,32 \pm 0,04^{a,b,A}$	$3,16 \pm 0,05^{a,b,A}$	$0,32 \pm 0,04^{a,b,A}$

*Os índices de Tukey em minúsculo são das análises em coluna; os índices em maiúsculo são das análises em linha.

O efeito antimicrobiano de proteínas ocorre devido aos peptídeos que formam sua estrutura que varia de eficiência de acordo com a bactéria e os peptídeos que compõe a nanoestrutura e a proteína nativa são os mesmos, não houve diferença significativa na ação antimicrobiana. Isso se justifica pelo fato dos peptídeos liberados pela hidrólise da α-la apresentarem pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana (BENKERROUM, 2010). A α-la nativa tem tamanho menor do que sua forma nanoestruturada, porém durante os ensaios da microplaca pode ter ocorrido aglomeração das proteínas deixando-as em tamanhos semelhantes, isso explicaria a semelhança na atividade antimicrobiano.

Na literatura não há estudos de atividade antimicrobiana com nano α-la, entretanto OMARA (2018) estudando hidrolisados de α-la mostrou que a proteína teve efeito inibitório em *E. coli* com halo de inibição de 16,80 mm e *S. aureus* com halo de inibição de 12,50 mm.

5.3. Propriedades de espuma e emulsão

A Tabela 11 mostra o aumento do volume da espuma e a estabilidade de espuma da dispersão de α-la nanoestruturada pura e da α-la nativa pura. A proteína nanoestruturada obteve um aumento maior de espuma do que a proteína nativa e pelo teste de tukey ambas as médias são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). A nanoestruturação da α-la alterou a propriedade de formação de espuma da proteína, aumentando a sua capacidade de formar espuma. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que a formação de espuma de proteínas, formada por agitação em alta velocidade, está relacionada com a conformação, tamanho, composição de aminoácidos e propriedades físico-químicas da proteína (MEHLA; KUMARI; DHANKHAR; BUMBADIYA *et al.*, 2020).

Em trabalho utilizando α-la nativa e conjugados com as gomas guar, CMC, pectina e alfarroba desenvolvido por BOGGIONE SANTOS; HERNANDEZ HERNANDEZ; CARDOSO COSTA; DE QUEIROZ LAFETÁ *et al.* (2019), os autores encontraram um aumento do volume da espuma de 132,50 ± 3,54 % de α-la nativa; o uso de polissacarídeos diminuiu a formação de espuma para 80,00 ± 0,00 % (guar), 50,00 ± 0,00 % (pectina), 35,00 ± 0,00 % (CMC) e 25,00 ± 0,00 % (alfarroba). D'ONOFRE COUTO; NOVAES DA COSTA; CASTRO LAURINDO; MORAES DA SILVA *et al.* (2021) obtiveram um aumento de volume (VI) de 33,33 ± 1,59 % para β-lactoglobulina (β-lg) nanoestruturada em solução NaCl 50 $mmol \cdot L^{-1}$, no mesmo solvente o VI para a proteína nativa foi de 19,56 ± 2,34 %; o processo de nanoestruturação melhorou a propriedade de incremente de espuma para a β-lg assim como encontrado para a α-la neste trabalho.

A estabilidade da espuma (FS) para a α-la nanoestruturada diminuiu com o passar do tempo, as diferenças estatísticas entre as médias pelo teste de Tukey corrobora esse resultado. Os resultados mostram que a proteína nanoestruturada apresentou espuma mesmo após 50 min da agitação. Diferentemente, a α-la nativa apresentou menor FS após 5 min da agitação quando comparado com a proteína nanoestruturada; o teste de Tukey indicou que as médias são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

O sistema da proteína nativa já não apresentava espuma após 25 min da agitação. A nanoestruturação da α-lactoalbumina possibilitou o aumento da estabilidade da espuma, uma

vantagem para aplicações alimentícias. A estabilidade da espuma está relacionada a estrutura compactada da proteína, isso impede a ruptura das bolhas de ar garantindo maior estabilidade da espuma (BOGGIONE SANTOS; HERNANDEZ HERNANDEZ; CARDOSO COSTA; DE QUEIROZ LAFETÁ *et al.*, 2019; MARINOVA; BASHEVA; NENOVA; TEMELSKA *et al.*, 2009).

A estabilidade da espuma (FS) encontrada por BOGGIONE SANTOS; HERNANDEZ HERNANDEZ; CARDOSO COSTA; DE QUEIROZ LAFETÁ *et al.* (2019) para a proteína nativa foi de 3,48 ± 0,14 %, e após 60 min os valores foram zero; para os conjugados a estabilidade da espuma durou por um período maior de tempo. Em estudos com β-lg nanoestruturadas desenvolvidos por D'ONOFRE COUTO; NOVAES DA COSTA; CASTRO LAURINDO; MORAES DA SILVA *et al.* (2021) os autores encontraram FS de 64,54 ± 5,06 % em 30 min e decaiu para 35,45 ± 5,06 após 120 min; enquanto que para a proteína nativa a variação foi de 35,61 ± 5,49 % (30 min) a 9,05 ± 1,65 % (120 min).

Tabela 11. Propriedades de incremento de volume de espuma e estabilidade de espuma ao longo do tempo para α-la nanoestruturada e nativa, com os respectivos testes de Tukey* ($p < 0,05$)

Sistema	VI (%)	FS5(%)	FS25(%)	FS50(%)
Nano α-la	$89,62 \pm 0,58^{a}$	$93,64 \pm 5,53^{a,A}$	$24,85 \pm 4,20^{a,B}$	$4,70 \pm 0,26^{a,C}$
α-la nativa	$72,37 \pm 0,00^{b}$	$58,33 \pm 14,43^{b,A}$	$0,00 \pm 0,00^{b,B}$	$0,00 \pm 0,00^{b,B}$

*Os índices de Tukey em minúsculo são das análises em coluna; os índices em maiúsculo são das análises em linha.

A tabela 12 mostra os resultados do índice de atividade de emulsão (IEA) e o índice de estabilidade de emulsão (ESI) nos intervalos de 5, 15 e 30 min após a homogeneização. A média do IEA para a nano α-la foi estatisticamente semelhante a α-la nativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), a atividade de emulsão não foi alterada pelo processo de nanoestruturação da proteína. O índice de emulsão varia com as alterações conformacionais da α-la provado pela alteração de pH e temperatura, estruturas globulares não conseguem aderir a interface água-óleo em condições dinâmicas para a formação da emulsão (ELLOUZE; VIAL; ATTIA; AYADI, 2019); como a α-la nanoestruturada possuí estrutura globular (Figura 9) se justifica os valores baixos de IEA.

Em estudos com proteínas do soro do leite, ELLOUZE; VIAL; ATTIA e AYADI (2019) obtiveram IEA entre 84 e 110 $m^2 \cdot g^{-1}$ para α-la bovina (2 $g \cdot L^{-1}$) variando o pH de preparação. D'ONOFRE COUTO; NOVAES DA COSTA; CASTRO LAURINDO; MORAES DA SILVA *et al.* (2021) em estudos com β-lactoglobulina nanoestruturada em solução de NaCl 50 $mmol \cdot L^{-}$

[1]encontraram IEA de 167,86 ± 3,54 $m^2 \cdot g^{-1}$, os autores também compararam as formas nativa e nanoestruturada da β-lg, a nanoestruturação da proteína altera as propriedades de emulsão.

A estabilidade da emulsão é um parâmetro importante para a proteína com interesse em aplicação alimentícia. Os valores de ESI aumentaram com o passar do tempo, sendo que, os valores para a proteína nanoestruturada foram maiores do que a proteína nativa. O teste de Tukey ($p<0,05$) corrobora essa comparação. Isso indica que a atividade interfacial da nano α-la é maior do que a da sua forma nativa; por serem moléculas anfifílicas as proteínas quando em interface óleo-água tendem a expor as porções ou aminoácidos hidrofóbicas para o óleo e as hidrofílicas para a água, essa rede viscoelásticas possibilita estabilidade do sistema (MEHLA; KUMARI; DHANKHAR; BUMBADIYA *et al.*, 2020). D'ONOFRE COUTO; NOVAES DA COSTA; CASTRO LAURINDO; MORAES DA SILVA *et al.* (2021) estudando β-lg em NaCl 50 mmolL-1, encontraram ESI de 164,00 ± 3,46 para a nanoestrutura e 112,00 ± 3,46 para a sua forma nativa.

Tabela 12. Propriedade de índice de atividade de emulsão (IEA) em m^2g^{-1} e estabilidade de emulsão em min dos sistemas de α-la nanoestruturada e nativa, com os seus respectivos testes de Tukey ($p < 0,05$).

Sistema	IEA ($m^2 \cdot g^{-1}$)	ESI5 (min)	ESI15 (min)	ESI30 (min)
Nano α-la	$0,45 \pm 0,01^{a}$	$14,19 \pm 0,36^{a,A}$	$33,78 \pm 1,95^{a,B}$	$67,98 \pm 0,49^{a,C}$
α-la nativa	$0,47 \pm 0,02^{a}$	$15,11 \pm 2,11^{a,A}$	$29,20 \pm 1,84^{b,B}$	$46,61 \pm 1,30^{b,C}$

*Os índices de Tukey em minúsculo são das análises em coluna; os índices em maiúsculo são das análises em linha.

5.4. Encapsulação de Bioativos em α-lactoalbumina

A Tabela 13 mostra o comportamento da eficiência de encapsulação (EE) e capacidade de ligação (LC) da quercetina em α-la nanoestruturada e nativa. Para o sistema da proteína nanoestruturada o aumento da concentração de bioativo aumenta a eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação. A concentração de $300,00 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot mL^{-1}$ apresentou maiores valores de EE% e LC% quando comparado com as demais concentrações. Esse resultado é corroborado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Diferentemente, os valores de EE% do sistema da α-la nativa manteve-se com valores estatisticamente semelhantes com o aumento da concentração de quercetina; os valores de LC% aumentaram com o aumento da concentração de quercetina. No último ponto, na concentração de $300,0 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot mL^{-1}$ a EE% e LC% decaíram, sendo então a concentração de $100,0 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot mL^{-1}$ que apresentou maiores valores de EE% e LC% em comparação com os demais sistemas.

Quando comparado os dois sistemas, α-la nanoestruturada e nativa, os valores de EE% e LC% da proteína nanoestruturada foram maiores do que a da nativa em todas as concentrações. Pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) as médias de EE% e LC% da nano α-la são estatisticamente diferentes das médias do sistema α-la nativa. A nanoestruturação melhorou a capacidade de encapsular a quercetina. Este comportamento é esperado pois quando a α-lactoalbumina está em solução com baixa força iônica, como no caso desse trabalho, é formado glóbulos fundidos devido a estrutura terciária incompleta expondo maior hidrofobicidade, favorecendo a encapsulação da quercetina e de outras moléculas apolares (KIMPEL; SCHMITT, 2015). Estudos desenvolvidos por DESMET; HANSSENS e VAN CAUWELAERT (1987) mostram que a adição de Na^{+} ou Ca^{+2} em α-lactoalbumina aumenta a hidrofobicidade da proteína.

Esse fenômeno de alta porcentagem de eficiência de encapsulação de aproximadamente 99% pode ser explicado pelo caráter hidrofóbico da quercetina que, em meio aquoso, busca ligar-se as regiões hidrofóbicas da proteína (CHAVOSHPOUR-NATANZI; SAHIHI, 2019). Possivelmente, a nanoestruturação aumentou a exposição de sítios hidrofóbicos da cadeia da proteína.

Na literatura não há trabalhos que utilizam nano α-la como encapsulante de quercetina, porém encontra-se outros sistemas nanotecnológicos ou outras proteínas do soro do leite. CHAVOSHPOUR-NATANZI e SAHIHI (2019) obteve uma eficiência de encapsulação de 93,6 ± 0,520 % e capacidade de ligação de 10,4 ± 0,006 % utilizando β-lactoglobulina nanoestruturada em acetona como solvente. HAO; GUO; YU; ZHANG *et al.* (2017) encapsulou quercetina em nanocápsulas de lipossomo/quitosana e obteve uma eficiência de encapsulação de 71,14 %.

Para aplicação nos queijos, liberação controlada e demais caracterizações, escolheu-se a maior concentração de quercetina para a encapsulação em nano α-la ($300,00.10^{-5}$ mmol·L^{-1}) e para a α-a nativa a concentração escolhida foi de 100.10^{-5} mmol·L^{-1}, uma vez que apresentou maior valor de EE e de LC.

Tabela 13. Dados de eficiência de encapsulação e de capacidade de ligação da Quercetina em α-la nanoestruturada e nativa, com o teste de Tukey* ($p < 0,05$)

	α-la nanoestruturada + quercetina		**α-la nativa + quercetina**	
Concentração (mmol·mL^{-1})·10^5	**EE (%)**	**LC (%)**	**EE (%)**	**LC (%)**
8,25	$89,55 \pm 3,73^{c,A}$	$7,50 \pm 0,09^{a,A}$	$64,67 \pm 7,27^{a,B}$	$2,29 \pm 0,84^{c,B}$
16,50	$97,34 \pm 0,10^{a,b,A}$	$18,45 \pm 2,33^{a,b,A}$	$71,99 \pm 5,78^{a,b,B}$	$6,29 \pm 0,66^{c,d,B}$

33,10	96,89 ± 0,44^{a,b,A}	25,37 ± 0,58^{b,c,A}	77,67 ± 5,40^{a,b,B}	11,34 ± 1,75^{a,d,B}
50,00	96,18 ± 0,62^{a,b,A}	35,92 ± 3,80^{b,A}	83,48 ± 4,40^{b,B}	18,68 ± 1,77^{a,b,B}
100,00	95,49 ± 1,34^{a,b,A}	55,95 ± 6,83^{c,A}	84,97 ± 2,27^{b,B}	28,97 ± 5,96^{e,B}
200,00	92,09 ± 0,32^{a,c,A}	60,92 ± 10,92^{c,A}	83,82 ± 0,19^{b,B}	24,87 ± 3,72^{e,B}
300,00	98,49 ± 0,28^{b,A}	74,33 ± 1,22^{c,d,A}	69,73 ± 4,78^{a,b,B}	17,75 ± 2,70^{a,b,B}

*Os índices de Tukey em minúsculo são das análises em coluna; os índices em maiúsculo são das análises em linha.

A Tabela 14 mostra os dados obtidos da encapsulação da vitamina B2 em α-lactoalbumina nanoestruturada e nativa. Para o sistema nano α-la a EE% e a LC% aumentaram conforme o aumento da concentração de vitamina B2 até a concentração de $24{,}00 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1} em seguida ambos os parâmetros diminuiram. Esse comportamento é comprovado pelo teste de Tukey em que os cinco primeiros pontos, de $4{,}0 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1} a $20{,}0 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1}, apresentaram médias estatisticamente similares, enquanto que com $32{,}0 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1} de vitamina B2 a porcentagem se assemelha a concentração inicial e com $40{,}0 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1} a eficiência foi menor, com média estatisticamente diferente pelo teste de Tukey.

A vitamina B2 encapsulou uma menor quantidade de moles do que a quercetina em nano α-la. Possivelmente ocorreram os seguintes fenômenos no sistema: i) a natureza hidrofílica da riboflavina formou interações de Van der Walls e ligação de hidrogênio com a proteína; ii) possivelmente, há menos sítios hidrofílicos disponíveis na proteína; iii) Competição pelas porções hidrofílicas da proteína que interagem entre si, com a água e os íons presentes na solução; e iv) o tamanho e a estrutura molecular da vitamina B2 dificultam a difusão e a interação de maior quantidade de moléculas.

O sistema α-la nativa, apresentou um comportamento diferente. Para as concentrações iniciais os valores de EE% e LC% foram maiores quando comparado com as demais, o aumento da concentração de vitamina B2 diminuiu os valores de EE% e LC% do sistema. Como hipótese pode-se inferir que o aumento da concentração da vitamina B2 causou uma competição pelos sítios ativos hidrofílicos da cadeia proteica o que provocou alterações conformacionais na estrutura terciária da proteína tornando os sítios hidrofílicos mais escassos.

Quando camparado os dois sistemas (nano α-la e α-la nativa) os resultados de EE% e LC% foram maiores para a proteína nativa do que para a nanoestrutrada em todas as concentrações. Esse resultado é corroborado pelo teste de Tukey ($p<0{,}05$). Possivelmente, isso ocorre devido a maior hidrofobicidade da α-la nanoestruturada.

Apesar da literatura não apresentar estudos utilizando nano α-la como agente encapsulante de riboflavina, outros autores trabalham com a β-lactoglobulina (β-lg), também é uma proteína do soro do leite, porém diferentemente da α-la, é majoritariamente formada por folhas-β (GULZAR; BOUHALLAB; JARDIN; BRIARD-BION *et al.*, 2013). Estudos feitos por MADALENA; RAMOS; PEREIRA; BOURBON *et al.* (2016) estudaram a encapsulação de vitamina B2 em β-lactoglobulina e obtiveram EE 26 %.

Para aplicação nos queijos, liberação controlada e demais caracterizações escolheu-se a concentração de $24{,}00 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1} de vitamina B2 para a encapsulação em nano α-la, e $4 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1} para α-la nativa, uma vez que apresentaram maiores valores de EE% e de LC%.

Tabela 14. Dados de eficiência de encapsulação e de capacidade de ligação da Vitamina B2 em α-la nanoestruturada e nativa, com o teste de Tukey* ($p < 0{,}05$)

	α-la nanoestruturada + vitamina B2		**α-la nativa + vitamina B2**	
Concentração (mmol·mL^{-1}).10^{-5}	**EE (%)**	**LC (%)**	**EE (%)**	**LC (%)**
4,00	$50{,}39 \pm 4{,}33^{a,b,A}$	$2{,}39 \pm 0{,}23^{a,A}$	$78{,}60 \pm 0{,}23^{a,B}$	$4{,}73 \pm 0{,}23^{a,B}$
8,00	$62{,}79 \pm 2{,}16^{a,b,A}$	$2{,}31 \pm 0{,}21^{a,A}$	$74{,}74 \pm 1{,}92^{a,B}$	$19{,}25 \pm 1{,}14^{a,b,B}$
16,00	$60{,}98 \pm 3{,}08^{a,b,A}$	$9{,}84 \pm 1{,}02^{c,A}$	$51{,}86 \pm 3{,}91^{b,A}$	$17{,}17 \pm 1{,}90^{a,b,B}$
20,00	$69{,}37 \pm 0{,}82^{b,A}$	$12{,}38 \pm 0{,}15^{b,A}$	$50{,}42 \pm 6{,}26^{b,A}$	$14{,}94 \pm 1{,}28^{a,b,A}$
24,00	$69{,}31 \pm 0{,}68^{b,A}$	$13{,}08 \pm 0{,}17^{b,A}$	$55{,}93 \pm 1{,}60^{b,B}$	$20{,}21 \pm 2{,}29^{a,b,B}$
32,00	$53{,}52 \pm 2{,}99^{a,c,A}$	$1{,}73 \pm 0{,}15^{a,A}$	$47{,}12 \pm 6{,}72^{b,A}$	$19{,}52 \pm 6{,}08^{a,b,A}$
40,00	$41{,}42 \pm 1{,}16^{c,A}$	$1{,}30 \pm 0{,}07^{a,A}$	$50{,}99 \pm 0{,}55^{b,A}$	$26{,}56 \pm 0{,}55^{c,B}$

*Os índices de Tukey em minúsculo são das análises em coluna; os índices em maiúsculo são das análises em linha.

A Tabela 15 mostra o tamanho dos encapsulados. Pelo teste de Tukey a nano α-la pura e quercetina encapsulada em nano α-la apresentaram médias de tamanho e PDI estatisticamente semelhantes, dentro da faixa de tamanho estabelecida para nanotecnologia e boa dispersividade. O potencial zeta do encapsulado de quercetina foi de -47,93 ± 3,07 mV, portanto esse sistema é eletrostaticamente estável. A quercetina mostra-se com sendo um estabilizador eletrostático

da nano α-la produzida neste trabalho uma vez que a nanoproteína pura apresentou instabilidade pelo potencial zeta.

A estabilidade eletrostática das nanocápsulas proteicas com quercetina pode ser explicado da seguinte forma: a nanoestruturação aumenta a hidrofobicidade da α-la favorecendo a interação com os anéis aromáticos da quercetina que também é hidrofóbica (CHAVOSHPOUR-NATANZI; SAHIHI, 2019). Com isso ocorre a diminuição da energia livre de Gibbs do sistema desfavorecendo a agregação das moléculas equilibrando as energias repulsivas e atrativas (LEITE; RIBEIRO, 2012).

O encapsulado de vitamina B2 apresentou tamanho muito acima do limite para ser considerado nanomaterial e um PDI alto, indicando agregação das moléculas. O potencial zeta indicou um sistema eletrostaticamente instável com um valor de Zeta de –18,2 mV. Em comparação com os demais sistemas apresentou média estatisticamente diferente pelo teste Tukey para o tamanho e PDI. O potencial zeta foi estatisticamente semelhante a nanoproteína pura. DU; BAO; HUANG; JIANG *et al.* (2019) encapsularam caroteno em nano α-la de 19 nm e observaram um aumento no tamanho das micelas para 22 nm.

O aumento de tamanho do encapsulado nano α-la/vitamina B2 tem relação com a natureza hidrofílica da riboflavina que possibilitou interações de hidrogênio e Van der Waals nas porções hidrofílicas da proteína. A exposição das regiões hidrofóbicas aumenta a energia de Gibbs do sistema em solução salina (LEITE; RIBEIRO, 2012), favorecendo energias de atração e interação das regiões hidrofóbicas. Assim a polaridade das moléculas de vitamina B2 servem como agentes de nucleação para a agregação das estruturas de α-la (IPSEN; OTTE, 2007).

Tabela 15. Comparação dos parâmetros de raio hidrodinâmico (nm), PDI e potencial zeta (mV) entre a nano α-la e os encapsulados quercetina e vitamina B2, com os índices do teste de Tukey ($p < 0,05$).

Sistema	Tamanho (nm)	PDI	Zeta (mV)
Nano α-la	191,10 ± 21,33[a]	0,359 ± 0,059[a]	-7,71 ± 0,14[a]
Nano α-la + Quercetina	308,15 ± 26,80[a,b]	0,506 ± 0,054[a]	-47,93 ± 3,07[b]
Nano α-la + Vitamina B2	1103,30 ± 520,01[b]	0,826 ± 0,049[b]	-6,29 ± 2,28[a]

*Os índices em maiúsculo são das análises em coluna.

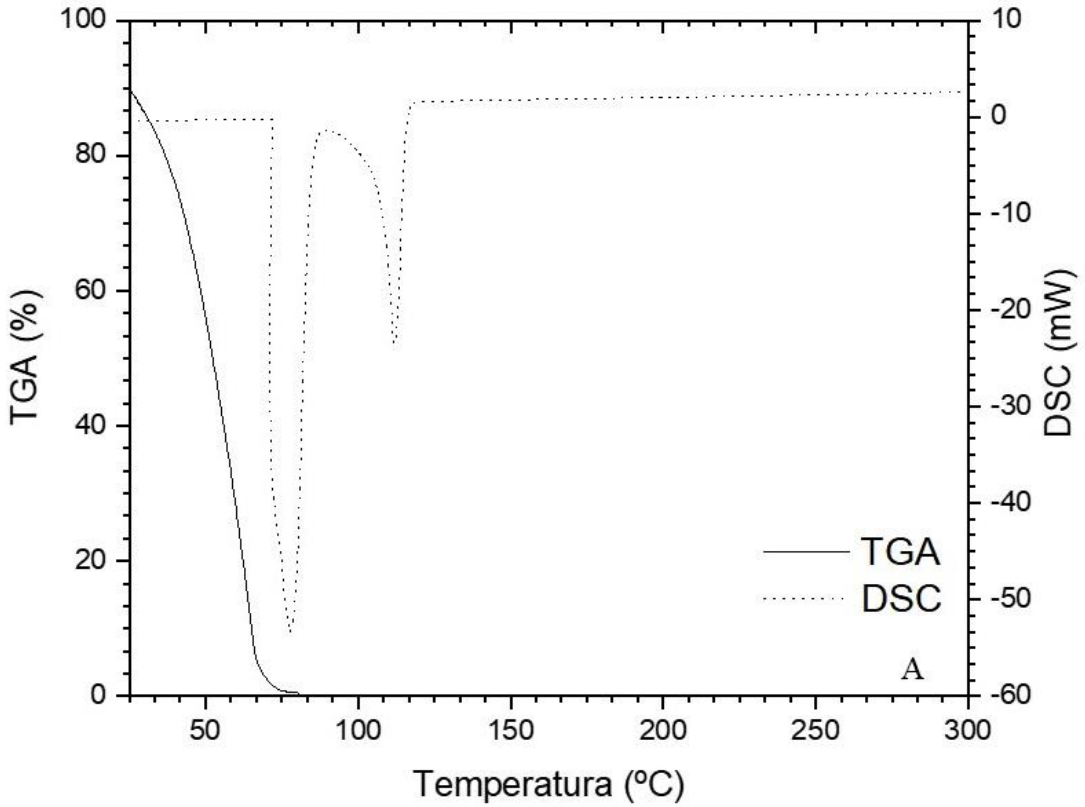
A Figura 8 (A-B) ilustra as curvas de TG e DSC para quercetina encapsulada em nano α-la e para a quercetina pura na concentração e solventes que foram utilizados para a encapsulação. A curva de TG para o encapsulado de quercetina apresentou uma queda de 25 ºC até 68,29 ºC, como a perda de massa foi maior do que 50 % ocorreram a decomposição do material nessa

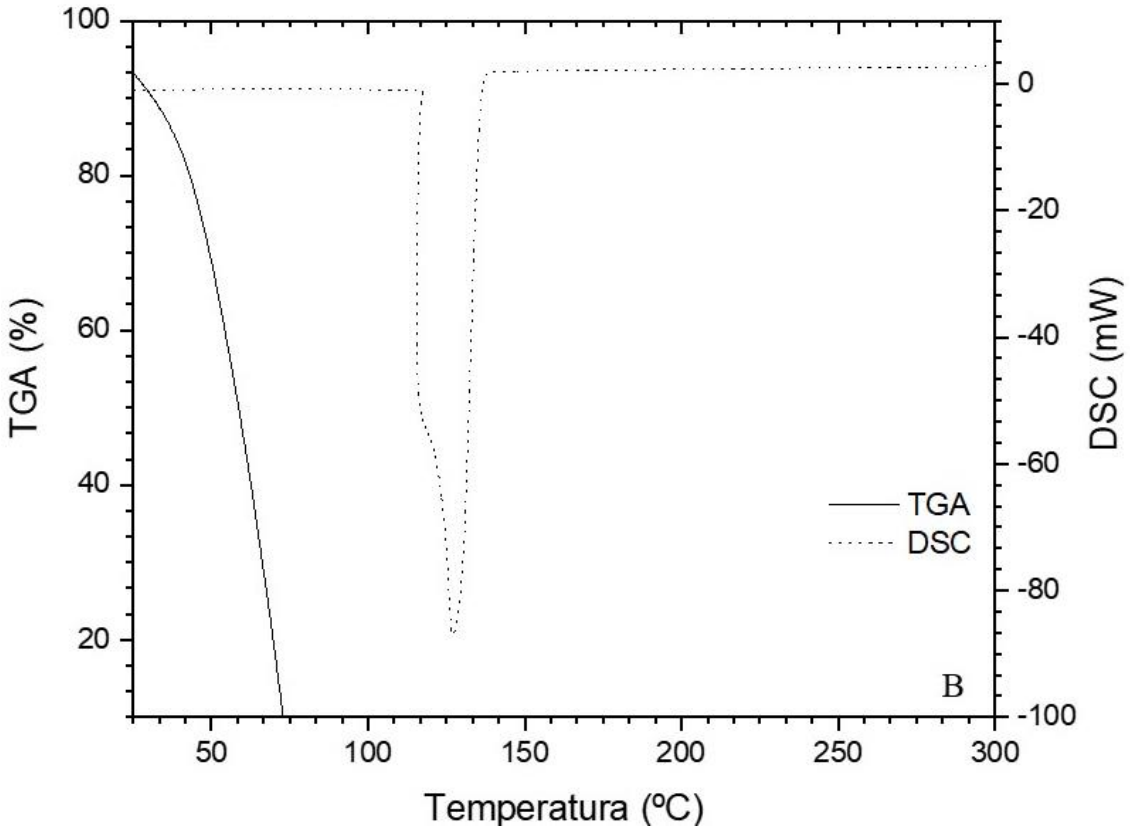
faixa de temperatura. Esse valor foi menor do que foi encontrado para a nano α-la. A queda da curva de TG para a quercetina foi de 25 ºC até 76,92 ºC, também ocorreu a decomposição da amostra nessa faixa de temperatura.

O DSC para o encapsulado apresentou duas curvas endotérmicas; a primeira tem pico em 77,68 ºC com variação de entalpia de 1350 $J \cdot g^{-1}$. A segunda tem pico em 111,83 ºC e ΔH de 336,58 $J \cdot g^{-1}$. A análise para a quercetina pura apresentou uma curva endotérmica com pico em 126,76 ºC e ΔH 2080 $J \cdot g^{-1}$. Para SAHOO; KAKRAN; SHAAL; LI *et al.* (2011) a temperatura de decomposição da quercetina foi de 325 ºC com ΔH de 153,5 $J \cdot g^{-1}$.

A quercetina ocupa sítios de ligação hidrofóbicos da nano α-la, ou seja, foi carreada pela nanocápsula; isso altera as interações intermoleculares e intramoleculares, essa alteração de forças de ligação e de interação modifica a energia necessária para romper todas as ligações do sistema. Isso explica a diferença de temperatura e de entalpia de decomposição (SAHOO; KAKRAN; SHAAL; LI *et al.*, 2011; VERMA; SHARMA; SHARMA; KAUR LAMBA *et al.*, 2017).

Figura 8. Curva da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC). A) nano α-la + quercetina $300 \cdot 10^{-5}$ $mmol \cdot mL^{-1}$. B) quercetina 300 $mmol \cdot mL^{-1}$.

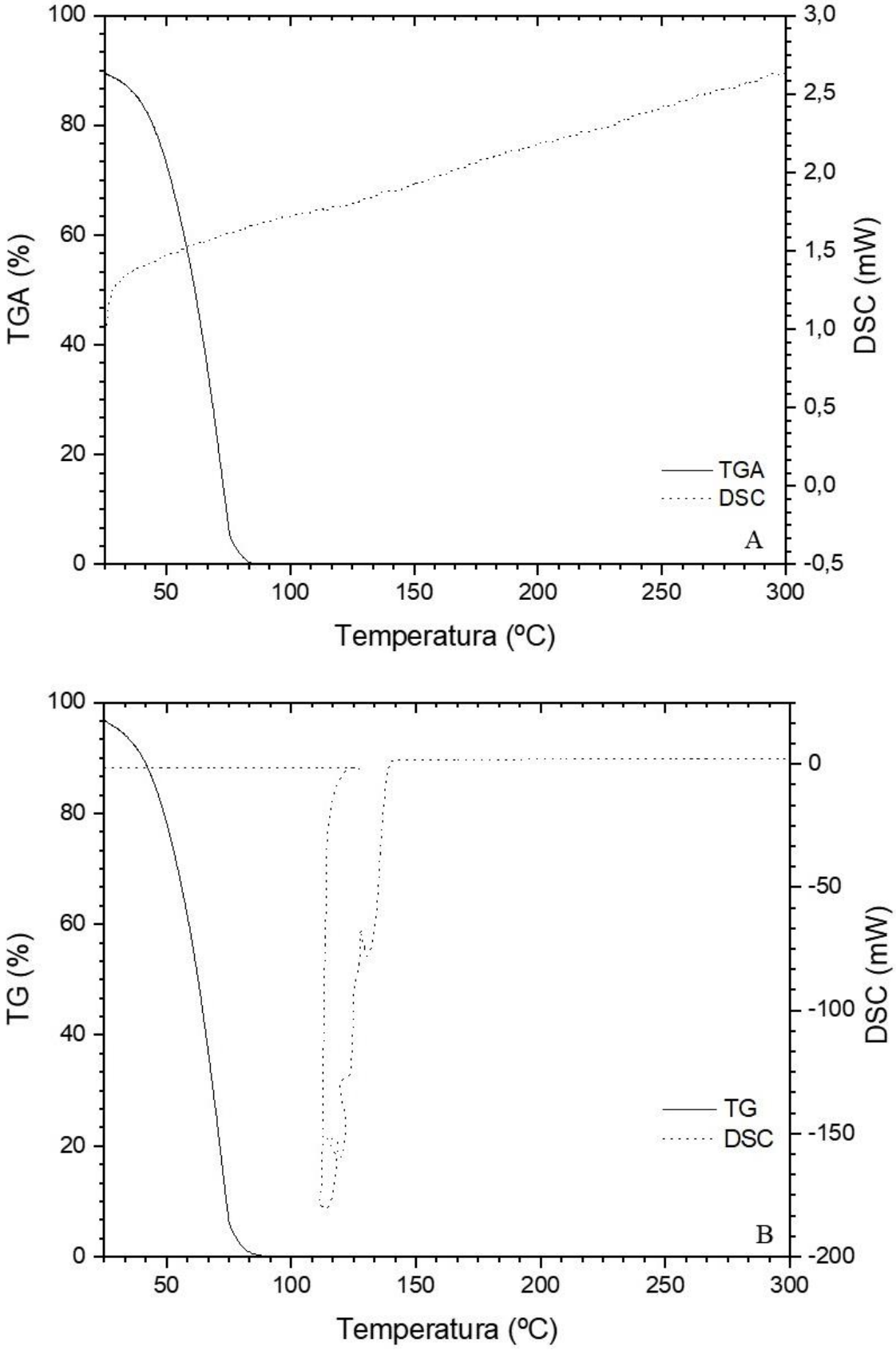




A Figura 9 (A-B) ilustra as curvas de TG e DSC para vitamina B2 encapsulada em nano α-la e para a vitamina B2 pura na concentração e solvente que foram utilizados para a encapsulação. A curva de TG para o encapsulado apresentou uma única queda de 25 a 77,94 ºC, temperatura de desnaturação de toda a amostra; para a vitamina B2 pura a queda da porcentagem de massa ocorreu em uma única etapa de 25 a 77,82 ºC, com a amostra toda decomposta. A DSC tanto para o encapsulado da vitamina B2 e quanto para a vitamina B2 pura, não foi possível calcular na faixa de temperatura trabalhada. O sistema encapsulado não apresentou curva de DSC. A amostra de vitamina B2 pura apresentou picos endotérmicos sobrepostos, entretanto a temperatura de pico foi a 113,87 ºC. Estudos desenvolvidos por FERREIRA; ALARCON; PERPÉTUO e BANNACH (2019) encontraram que a temperatura de desnaturação da vitamina B2 pura foi em 304 ºC; os autores não calcularam a entalpia pois ocorreu eventos endotérmicos e exotérmicos sobrepostos.

A vitamina B2 ocupa sítios de ligação hidrofílicos, como regiões com sulfetos, da nano α-la, assim como a quercetina, essas interações do bioativo com a proteína altera a conformação e todas as interações intramoleculares e intermoleculares (FERREIRA; ALARCON; PERPÉTUO; BANNACH, 2019), assim a temperatura e a energia de desnaturação são alteradas quando comparado com a nano α-la sem ligantes.

Figura 9. Curva da análise termogravimétrica (TGA) e da calorimetria diferencial de varredura (DSC). A) nano α-la + vitamina B2. B) vitamina B2 $24 \cdot 10^{-5}$ mmol·mL^{-1}.



5.5. Liberação controlada *in vitro*

A Figura 10 A e B mostram os resultados da liberação controlada de quercetina e vitamina B2 encapsulada em α-la nanoestruturada em simulação de fluido gástrico (SG), fluido gástrico com pepsina 0,1 % (m/v; SGP), fluido intestinal (SI) e fluido intestinal com pancreatina 1 % (m/v; SIP). A porcentagem da liberação de quercetina aumenta com o passar do tempo até atingir um valor constante entre 90 e120 min, com LC(%) de 26,86 ± 2,06 % e 27,20 ± 3,57 %, respectivamente. Os resultados do teste de Tukey ($p < 0,05$) corroboram esse comportamento.

Comportamento semelhante ocorre no sistema SGP em que a porcentagem de quercetina liberada aumenta com o tempo alcançando valor máximo a partir de 90 min. Entretanto, os valores são menores do que o sistema sem a pepsina, sendo 16,68 ± 0,29 % em 90 min e 17,41 ± 0,39 % em 120 min. O teste de tukey ($p < 0,05$) comprova esse comportamento. Possivelmente, a presença da enzima provocou a hidrolise parcial da proteína expondo mais sítios de ligação hidrofóbicos, assim a quercetina permaneceu ligada à molécula proteica, desfavorecendo a sua liberação (CHAVOSHPOUR-NATANZI; SAHIHI, 2019).

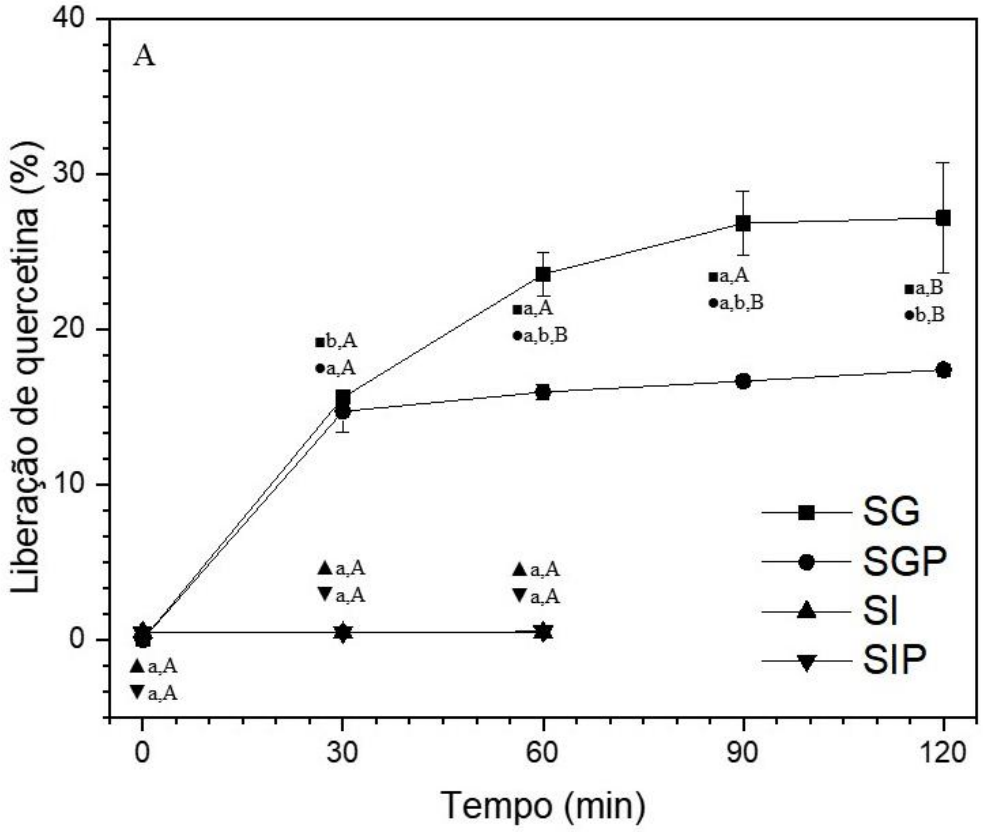
Ambos os sistemas simulando fluido intestinal, SI e SIP, obteve a liberação de quercetina constante e próxima de zero. Esse comportamento é comprovado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com as médias estatisticamente similares. Comparando os dois sistemas com e sem enzima, a adição de enzima não alterou o comportamento da liberação controlada da quercetina.

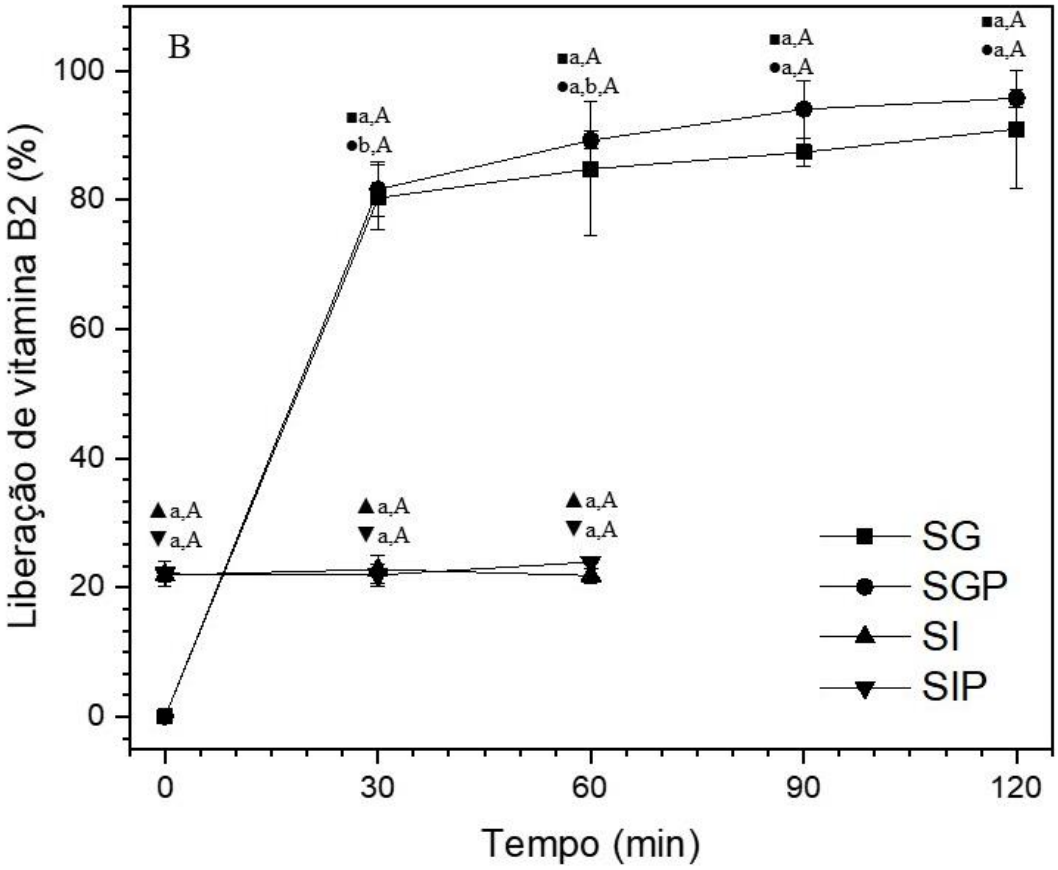
Quanto a liberação da vitamina B2, nos sistemas SG e SGP, a porcentagem de liberação foi constante e próximo de 100 % a partir de 30 min. A nano α-la não protegeu a vitamina B2 em solução de pH 1,2. Comparando ambos os sistemas, SG e SGP, não houve diferença estatisticamente significativa entre médias ($p < 0,05$), sendo assim a adição da pepsina não provocou alterações na liberação da vitamina B2 no fluido gástrico.

A acidificação da dispersão proteica causa a hidrólise da α-la o que expõe sítios de ligação hidrofóbicos (CHAVOSHPOUR-NATANZI; SAHIHI, 2019); por ser uma molécula hidrofílica essa alteração conformacional da proteína liberou o bioativo, ou seja, a energia da ligação não foi suficiente para manter a vitamina B2 ligada à nano α-la.

Nos sistemas SI e SIP a liberação foi constante. O teste de Tukey ($p < 0,05$) mostrou que há diferença entre as médias do SI e SIP, portanto a presença da pancreatina alterou o comportamento da liberação. Observa-se a presença de vitamina B2 na solução tampão de pH 7,4 apesar de toda a liberação na solução de pH 1,2. A vitamina B2 determinada no SI foi o resquício após a centrifugação do sistema.

Figura 10. Dados da liberação controlada *in vitro* de quercetina encapsulada em α-la nanoestruturada simulando fluido gástrico sem e com pepsina, SG e SGP respectivamente e fluido intestinal sem e com pancreatina, SI e SIP respectivamente, com a representação dos índices de Tukey* ($p < 0,05$).





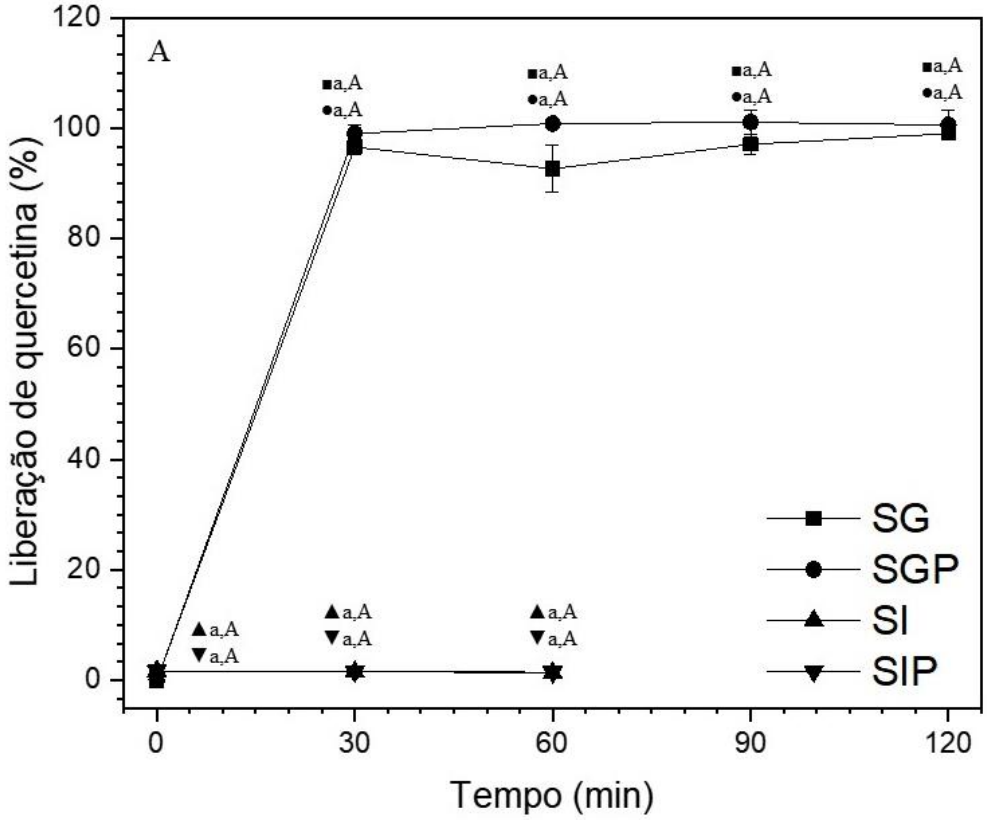
A Figura 11 A e B mostram os resultados da liberação controlada de quercetina e vitamina B2 encapsulada em α-la nativa em simulação de fluido gástrico (SG), fluido gástrico com pepsina 0,1 % (m/v; SGP), fluido intestinal (SI) e fluido intestinal com pancreatina 1 % (m/v; SIP). A liberação da quercetina foi próxima de 100 % em 30 min e manteve-se constante até 120 min em SG. Quando analisada no SI, a porcentagem está próxima a zero, a quercetina foi toda liberada no sistema simulando fluido gástrico com pH 1,2.

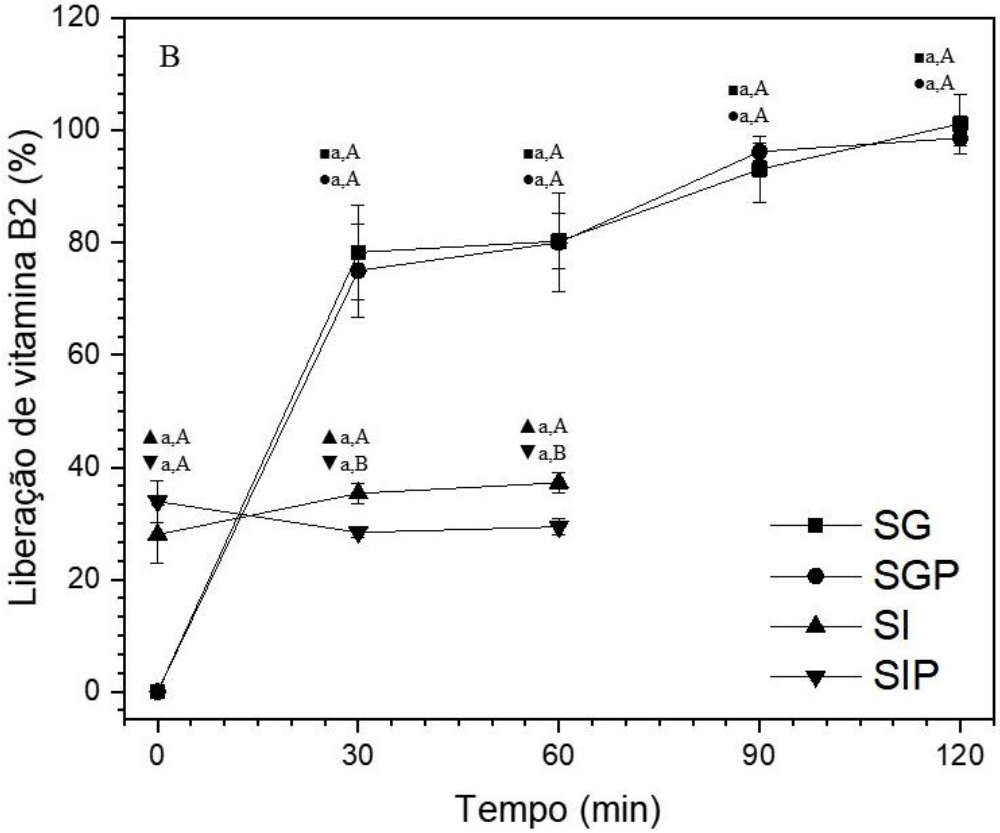
Os sistemas SGP e SIP apresentaram comportamento semelhante, a adição de enzimas não alterou a cinética da liberação controlada da quercetina. Os resultados do teste de Tukey ($p < 0,05$) corroboram esse comportamento. Os resultados de encapsulação deste trabalho sugerem que a proteína nativa possui mais sítios ativos hidrofílicos, consequentemente tem menor afinidade com a quercetina. Por esse motivo a hidrolise provocada pelo ácido desnaturou a proteína que liberou toda a quercetina logo no início dos ensaios.

A liberação controlada da vitamina B2 em SG aumentou com o passar do tempo, atingindo o patamar próximo de 100 % em 120 min. Em SI a liberação foi constante em valores próximos de 30 %. Comparando com SGP e SIP observa-se que a adição de enzimas não alterou o comportamento da liberação da vitamina B2 encapsulada em α-la nativa. O teste de Tukey (p <

0,05) mostrou que há diferença entre as médias dos sistemas. Os resultados da encapsulação obtidos nesse trabalho mostram que a α-la nativa tem domínios hidrofílicos e maior afinidade com a vitamina B2, isso pode ter contribuído com a liberação controlada ao longo do tempo, o bioativo ficou mais tempo aderido à proteína.

Figura 11. Dados da liberação controlada in vitro de quercetina encapsulada em α-la nativa simulando fluido gástrico sem e com pepsina, SG e SGP respectivamente e fluido intestinal sem e com pancreatina, SI e SIP respectivamente, com a representação dos índices de Tukey* ($p < 0,05$).





Estudos de liberação controlada *in vitro* simulando fluidos oral-gástrico-intestinal de quercetina encapsuladas em lipogeis composto por quitosana e gelatina desenvolvido por LIU; KONG; YE; SHEN *et al.* (2020), foi observado uma baixa liberação da quercetina no sistema gástrico, enquanto a liberação no fluido intestinal ocorreu de forma constante, sendo sistemas que conseguiram proteger a quercetina durante a digestão. VASHISTH; SINGH e PRUTHI (2015) estudaram a liberação controlada de quercetina encapsulada em poli(ácido lático-co-glicólico)-poli(ε-caprolactano), os autores constataram que a liberação foi aumentando até 20 h depois foi constante.

Observa-se que o perfil liberação da vitamina B2 no sistema com a nano α-la foi semelhante ao sistema da α-la nativa. Por outro lado, a liberação da quercetina no sistema da nano α-la foi mais lenta em comparação ao sistema da proteína nativa. Possivelmente, as forças de interações hidrofóbicas que ligam a quercetina à nano α-la são maiores do que as que a ligam na proteína nativa, portanto precisa-se de mais tempo para ocorrer toda a liberação no sistema estudado.

Há trabalhos na literatura que estuda a liberação da vitamina encapsulada em β-lg como o de MADALENA; RAMOS; PEREIRA; BOURBON *et al.* (2016) que estudaram a liberação controlada de vitamina B2 encapsulada em β-lg, os autores determinaram que 11 % da vitamina B2 foram liberadas no meio gástrico, sugerindo uma resistência da β-lg, pois a maior parte foi

liberada em outros sistemas, sendo 35 % no duodeno, 38 % no jejuno e 5 % íleo, a degradação da β-lg ocorreu no intestino delgado. Para DJOULLAH e SAUREL (2021) seguindo metodologia semelhante a realizada nesse trabalho, a liberação da vitamina B2 encapsulada em β-lg também ocorreu majoritariamente no sistema intestinal. A diferença estrutural entre a β-lg e a α-la pode explicar o fato de a β-lg ser mais resistente em meio ácido.

5.6. Queijo Minas Frescal

5.6.1. Análises Físico-químicas

A Tabela 16 mostra os valores das análises físico-químicas, pH e acidez titulável, realizadas nos queijos com nanoestruturas de acordo com o planejamento experimental tipo DCCR e com os queijos controle, sem a adição de nanoproteína.

O pH variou entre 6,57 e 7,14, entretanto, as variações das médias não apresentaram diferença estatística significativa pelo teste Tukey. O teste de ANOVA para o pH com intervalo de confiança de 95% indica que as variáveis independentes não contribuíram para a variação do pH, sendo este resultado corroborado pelo gráfico de Pareto em que nenhuma variável ultrapassou a linha de significância. Portanto, pelas análises estatísticas a variação da massa de sais e do volume de proteína nanoestruturada não alteraram o comportamento do pH dos queijos.

Quando comparado com o controle é possível observar que não houve diferença significativa entre o pH dos queijos com nanoestruturas e dos queijos controle. Sendo assim, a adição de nano α-la não modificou o pH dos queijos. O pH dos queijos apenas varia com o tempo devido a presença de bactérias láticas durante a maturação ou quando há a presença de microrganismos contaminantes (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a).

Os valores de pH do queijo minas frescal deste experimento na faixa de valores relatados na literatura. MALHEIROS; SANT'ANNA; BARBOSA; BRANDELLI *et al.* (2012) encontraram valores de pH entre 6,49 e 6,56 em queijos minas frescal com *Lactobacillus casei* Zhang, similarmente, DANTAS; JESUS; SILVA; ALMADA *et al.* (2016) encontraram pH entre 5,24 e 6,69 em queijos minas frescal com nisina encapsulada em lipossoma. FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) encontraram pH de 6,72 para queijo minas frescal feito com adição de ácido lático e cultura probiótica de *bifidobacterium* Bb-12.

A acidez titulável (AT), pelo teste Tukey, não apresentaram variação estatística significativa entre as médias, variando entre 0,10 ± 0,02 e 0,16 ± 0,00 g de ácido lático/g de queijo. Quanto ao controle, as amostras apresentaram diferença significativa entre as médias, sendo assim

pode-se inferir que a presença da nano α-la influencia no comportamento da acidez titulável. Esse comportamento é possível pois a nanoproteína pode ter algum efeito no controle do crescimento de bactérias láticas durante a maturação do queijo, que permaneceu 4 dias em geladeira, responsáveis pela manutenção do ácido lático no queijo (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a).

A acidez titulável dos queijos do controle apresentaram diferença significativa entre si pelo teste de Tukey. Esses resultados indicam que a baixa concentração de NaCl pode interferir na AT do queijo. Possivelmente, a nano α-la atuou como um agente de controle das bactérias e manteve o pH e a acidez titulável nos valores desejados, mesmo em menores concentrações de sal.

FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) estudando queijo *minas frescal* acidificado, obtiveram acidez de 0,099 ± 0,02 g/100g de queijos minas frescal acidificado sem adição ácido lático. Em queijos minas *frescal* adicionados de ácido lático os autores obtiveram 0,109 ± 0,02 g de ácido lático/100 g de queijo. Os valores estão mais elevados do que os obtidos neste trabalho, pois além da adição do ácido lático os autores utilizaram bifidobacteria como bactérias de *start* favorecendo a maior produção de ácido lático.

A ANOVA para a acidez titulável mostra que nenhuma variável independente influencia na resposta acidez titulável. No gráfico de Pareto nenhuma variável ultrapassou a linha de significância. Pelas análises estatísticas a acidez titulável não foi afetada pela variação da metodologia de produção de queijo.

Tabela 16. Resultados obtidos nas análises físico-químicas de pH e acidez titulável seguindo o planejamento experimental DCCR para os queijos com nanoestruturas e para os queijos controle com seus testes de Tukey (p = 0,01).

Ensaio	**pH**		**Acidez Titulável (g de ácido lático/g de amostra)**	
	Queijo com nanoestrutura	**Queijo Controle**	**Queijo com nanoestrutura**	**Queijo Controle**
1	$6,59 \pm 0,04^{a,A}$	$6,61 \pm 0,16^{a,b,c,A}$	$0,14 \pm 0,00^{a,A}$	$0,19 \pm 0,01^{a,c,B}$
2	$6,80 \pm 0,05^{a,b,A}$	$6,10 \pm 0,16^{c,A}$	$0,15 \pm 0,01^{a,A}$	$0,23 \pm 0,00^{b,c,B}$
3	$6,57 \pm 0,15^{a,A}$	$6,29 \pm 0,07^{e,A}$	$0,11 \pm 0,00^{a,A}$	$0,13 \pm 0,01^{a,B}$
4	$6,82 \pm 0,07^{a,b,A}$	$6,23 \pm 0,06^{e,A}$	$0,10 \pm 0,01^{a,A}$	$0,13 \pm 0,01^{a,B}$
5	$6,88 \pm 0,15^{a,b,A}$	$6,86 \pm 0,14^{b,c,A}$	$0,14 \pm 0,01^{a,A}$	$0,28 \pm 0,02^{b,d,B}$
6	$6,80 \pm 0,11^{a,b,A}$	$6,26 \pm 0,08^{d,A}$	$0,15 \pm 0,02^{a,A}$	$0,28 \pm 0,00^{b,d,B}$
7	$6,91 \pm 0,10^{a,b,A}$	$6,47 \pm 0,07^{d,A}$	$0,15 \pm 0,00^{a,A}$	$0,34 \pm 0,04^{d,B}$

8	6,70 ± 0,04^{a,A}	6,59 ± 0,06^{a,b,A}	0,15 ± 0,00^{a,A}	0,25 ± 0,03^{b,c,B}
9	6,78 ± 0,08^{a,A}	6,76 ± 0,11^{a,b,c,A}	0,16 ± 0,00^{a,A}	0,14 ± 0,01^{a,B}
10	6,80 ± 0,16^{a,b}		0,12 ± 0,00^{a}	
11	6,82 ± 0,03^{a,b}		0,11 ± 0,00^{a}	
12	6,83 ± 0,03^{a}		0,11 ± 0,03^{a}	
13	6,72 ± 0,03^{a}		0,11 ± 0,03^{a}	
14	6,84 ± 0,12^{a,b}		0,11 ± 0,01^{a}	
15	6,66 ± 0,12^{a}		0,12 ± 0,01^{a}	
16	7,14 ± 0,05^{b}		0,10 ± 0,02^{a}	
17	6,83 ± 0,14^{a,b}		0,11 ± 0,01^{a}	

Os índices em minúsculo representa a comparação das médias dos queijos com nanoestruturas; os índices em maiúsculo representa a comparação entre as médias dos queijos com nanoestruturas com os queijos controle.

A Tabela 17 apresenta os resultados de sólidos solúveis e condutividade elétrica dos queijos com nanoestrutura e dos queijos controle. Os teores de sólidos solúveis variaram entre 3,94 ± 0,04 ºBrix e 7,42 ± 0,8 ºBrix e não apresentaram diferença estatística significativa pelo teste Tukey. Comparando com o controle, apenas as amostras 4 e 5 apresentaram diferença estatística. O ensaio 17 foi o único que apresentou uma diferença maior com as demais amostras. O queijo minas frescal possui baixo teor de sólidos solúveis, pelo fato dos sólidos solúveis serem carreados para o soro após a coagulação e dessoragem (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013).

A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % para os sólidos solúveis mostra que nenhuma variável independente influencia na resposta. O gráfico de Pareto para a mesma análise também indica que nenhum parâmetro ultrapassou a linha de significância. Portanto, os conteúdos de sólidos solúveis não foram afetados pela variação das quantidades de sais e de nano α-la.

A condutividade elétrica obteve valores entre 910,53 ± 110,77 $\mu S \cdot cm^{-1}$ e 4053,33 ± 175,02 $\mu S \cdot cm^{-1}$ e as médias apresentaram diferença estatística significativa pelo teste Tukey. A variação da condutividade está relacionada a quantidade de sal, NaCl e KCl, adicionadas durante a fabricação dos queijos. As amostras com maiores quantidades de sais apresentam maior condutividade elétrica.

A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % mostra que as concentrações de ambos os sais (NaCl e KCl) influenciam na resposta da condutividade. O gráfico de Pareto na Figura 12A mostra que ambos os parâmetros ultrapassaram a linha de significância; o NaCl e o KCl ambos com valor positivo indicam que com o aumento da concentração aumenta a condutividade. O teste F indica que as variáveis são significativas pois o F calculado de 17,12 foi maior do que o F tabelado de 2,726.

Comparando com o controle, as amostras apresentaram diferença estatística significativa entre si, apesar das massas de sais serem as mesmas. Esse comportamento pode ser explicado pela presença da nano α-la, pois os sais podem ter interagido com a nanoestrutura, diminuindo a sua difusão no meio pelo fato de ter aumentado a massa molecular do sistema sal-nano, diminuindo a condutividade elétrica.

A Figura 12B mostra a superfície de resposta da condutividade com a variação dos sais KCl e NaCl. A superfície mostra que quanto maior a concentração de sal, seja NaCl ou o KCl, maior a condutividade. A equação 9 representa a modelagem encontrada para a resposta da condutividade em relação às variáveis independentes.

$$z = 2715{,}5244x - 174{,}7467x^2 + 583{,}9789y - 146{,}3539y^2 + -235{,}2667xy \quad (9)$$

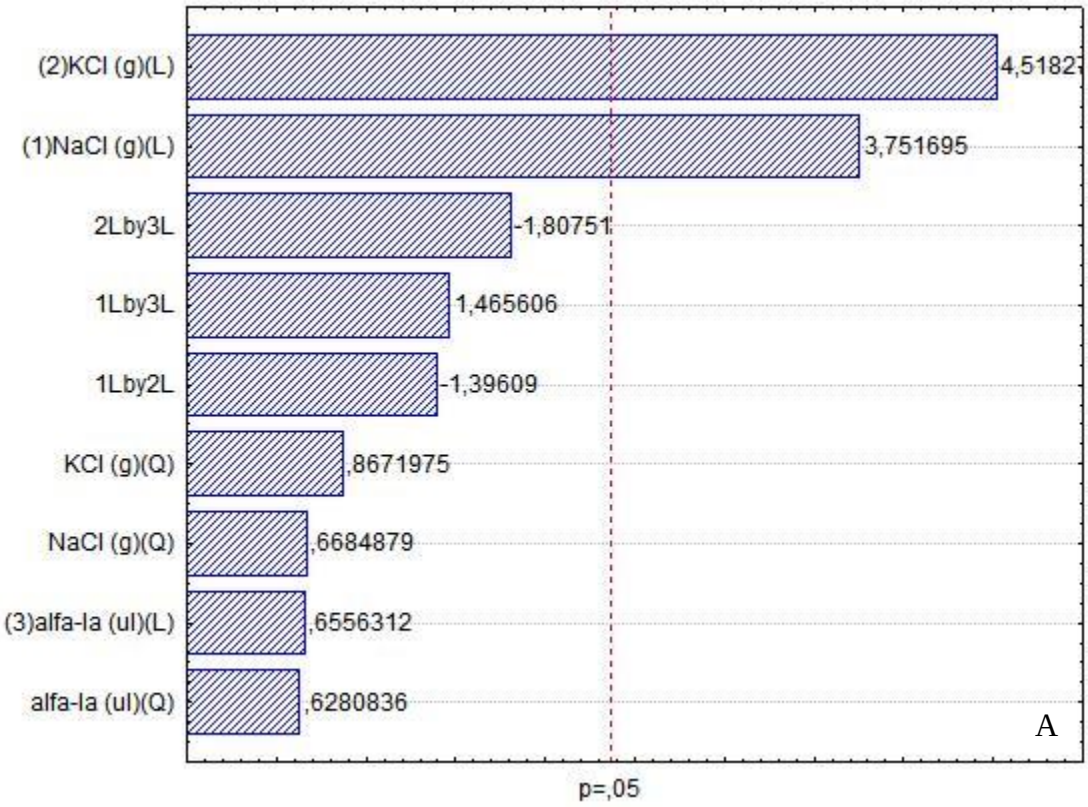
Onde: z é condutividade elétrica; x massa de NaCl; y massa de KCl.

Tabela 17. Resultados obtidos nas análises físico-químicas de teor de sólidos solúveis totais (ºBrix) e condutividade elétrica (µS/cm) seguindo o planejamento experimental DCCR para os queijos com nanoestruturas e para os queijos controle com seus testes de Tukey (p = 0,01).

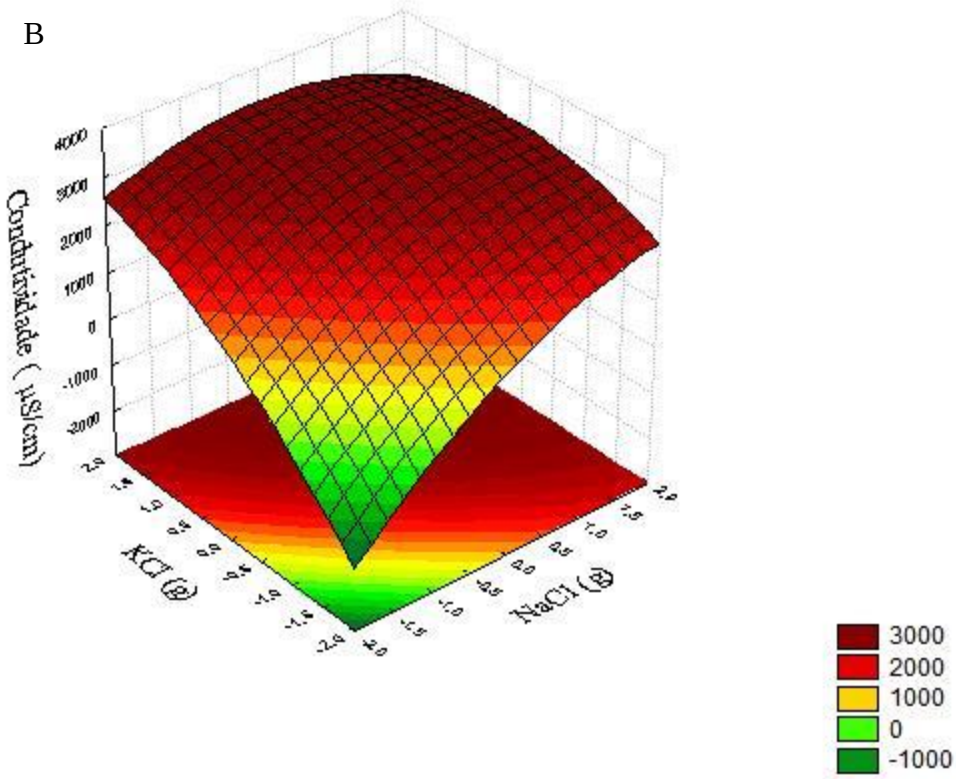
	Sólidos Solúveis (ºBrix)		**Condutividade (µS/cm)**	
Amostra	**Queijo com nanoestrutura**	**Queijo controle**	**Queijo com nanoestrutura**	**Queijo Controle**
1	$5{,}15 \pm 0{,}63^{a,b,c,A}$	$6{,}17 \pm 0{,}61^{a,b,A}$	$2875{,}00 \pm 35{,}35^{f,g,h,A}$	$1517{,}33 \pm 200{,}14^{a,B}$
2	$5{,}13 \pm 0{,}51^{a,b,c,A}$	$6{,}14 \pm 0{,}54^{a,b,A}$	$1121{,}00 \pm 4{,}24^{a,b,A}$	$2420{,}00 \pm 87{,}18^{b,c,B}$
3	$6{,}37 \pm 0{,}50^{c,d,e,f,B}$	$4{,}77 \pm 0{,}18^{a,b,B}$	$3290{,}00 \pm 367{,}69^{h,i,A}$	$2695{,}00 \pm 205{,}06^{c,d,A}$
4	$5{,}70 \pm 0{,}12^{b,c,d,e,B}$	$5{,}00 \pm 0{,}24^{a,b,A}$	$1563{,}67 \pm 41{,}00^{b,c,A}$	$3346{,}67 \pm 727{,}07^{d,B}$
5	$6{,}86 \pm 0{,}08^{d,e,f,B}$	$4{,}51 \pm 0{,}70^{a,A}$	$1675{,}00 \pm 78{,}522^{j,A}$	$1638{,}00 \pm 727{,}07^{a,b,B}$
6	$6{,}91 \pm 0{,}05^{e,f,A}$	$6{,}30 \pm 0{,}67^{a,b,A}$	$2590{,}00 \pm 78{,}10^{e,f,g,A}$	$1463{,}00 \pm 52{,}05^{a,B}$
7	$5{,}38 \pm 0{,}41^{a,b,c,d,A}$	$6{,}57 \pm 0{,}64^{b,A}$	$910{,}53 \pm 110{,}77^{a,A}$	$3040{,}00 \pm 180{,}28^{c,d,B}$
8	$5{,}39 \pm 0{,}54^{a,b,c,d,A}$	$6{,}29 \pm 0{,}65^{a,b,A}$	$3310{,}00 \pm 141{,}4^{h,i,A}$	$1026{,}33 \pm 128{,}68^{a,B}$
9	$7{,}42 \pm 0{,}8^{f,A}$	$5{,}48 \pm 0{,}63^{a,b,A}$	$3485{,}00 \pm 120{,}21^{i,A}$	$1682{,}67 \pm 23736^{a,b,B}$
10	$5{,}51 \pm 0{,}61^{b,c,d}$		$2455{,}00 \pm 91{,}92^{e,f}$	
11	$4{,}67 \pm 0{,}56^{a,b}$		$1240{,}33 \pm 121{,}33^{a,b}$	
12	$4{,}99 \pm 0{,}06^{a,b,c}$		$2700{,}00 \pm 62{,}45^{f,g}$	
13	$4{,}86 \pm 0{,}08^{a,b,c}$		$2933{,}33 \pm 89{,}63^{g,h}$	
14	$5{,}17 \pm 0{,}42^{a,b,c}$		$1166{,}00 \pm 27{,}22^{a,b}$	
15	$5{,}55 \pm 0{,}66^{b,c,d,e}$		$2155{,}50 \pm 54{,}45^{d,e}$	
16	$5{,}96 \pm 0{,}05^{b,c,d,e,f}$		$1752{,}50 \pm 43{,}13^{c,d}$	
17	$3{,}94 \pm 0{,}04^{a}$		$1740{,}67 \pm 28{,}87^{c,d}$	

Os índices em minúsculo representa a comparação das médias dos queijos com nanoestruturas; os índices em maiúsculo representa a comparação entre as médias dos queijos com nanoestruturas com os queijos controle.

Figura 12. Análises estatística da influência das variáveis independentes nas respostas da variável dependente condutividade elétrica dos queijos minas frescal. A) Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados com 17 corridas e 3 fatores. B) Superfície de resposta 3D tendo como variáveis independentes as massas de NaCl e de KCl (g) adicionados no processo de produção de queijo.



B



Um dos objetivos deste trabalho é diminuir a concentração de NaCl utilizada para a produção de queijos, sendo assim pode-se escolher uma concentração menor para a produção otimizada.

Nestas condições é esperado um valor de intermediário de condutividade, pois a presença dos sais tem importância nas propriedades físico-químicas do queijo, como na atividade de água, na textura, sabor, aroma e preservação (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013). Então, as condições otimizadas escolhidas foram valores intermediários ou mínimos de NaCl. A escolha da metodologia final dependerá das análises dos dados do TPA.

5.6.2. Análises de Perfil de Textura

A Tabela 18 mostra os resultados das análises de adesividade e elasticidade mensuradas no Texturômetro para todos os 17 ensaios realizados e para os 9 pontos de controle sem a nano α-la. A adesividade indica a força necessária para remover o alimento que adere a superfície da boca (CHEN; LARKIN; CLARK; IRWIN, 1979). Neste trabalho, os valores de adesividade alteraram nos ensaios, portanto as variáveis estudadas influenciaram neste resultado. Portanto, torna-se necessário estudar a relação da formulação do queijo com esse parâmetro, pois uma variação drástica pode alterar as características de textura do produto. É desejável um valor intermediário para a adesividade, pois o queijo minas frescal é um queijo de massa macia e úmida (DAGOSTIN; CARPINE; MASSON, 2013).

Tabela 18. Resultados obtidos na análise de perfil de textura realizada no Texturômetro seguindo os ensaios do delineamento apresentando os valores de adesividade, elasticidade.

	Adesividade (g.s)		**Elasticidade (adimensional)**	
	Queijo com nanoestrutura	**Queijo Controle**	**Queijo com nanoestrutura**	**Queijo Controle**
1	-8,3570	-2,284	0,8208	0,824
2	-6,7908	-7,937	0,8208	0,787
3	-47,0937	-3,700	0,7122	0,821
4	-69,0834	-1,548	0,7194	0,793
5	-2,256	-15,115	0,7535	0,749
6	-36,1520	-23,870	0,7375	0,821
7	-39,7682	-4,006	0,7491	0,797
8	-17,4394	-4,426	0,7755	0,766
9	-2,5865		0,8568	0,873
10	-2,9542		0,753	
11	-3,7092		0,8028	
12	-2,7659		0,8249	
13	-24,4990		0,7202	
14	-0,7100		0,8508	
15	-57,3427		0,8181	
16	-1,0742		0,7495	
17	-2,256		0,7747	

A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % para a variável Adesividade mostra que a interação da variação de KCl e nano α-lactoalbumina e as relações linear e quadrática da nano α-la influenciaram nos valores obtidos. O teste F para a adesividade, como o valor de F calculado foi de 30,687 e superior ao valor do F tabelado de 3,073 indica que as variáveis influenciam os valores de adesividade. O gráfico de Pareto (Figura 13A) mostra que a interação entre KCl e α-la e lactoalbumina e as relações linear e quadrática da nano α-la ultrapassaram a linha de significância, com valor de p = 0,05.

A Figura 13B mostra a relação da massa de NaCl (g) e do volume de α-la na resposta da adesividade; para qualquer concentração de sal o que altera a resposta de adesividade é a variação do volume de nanoproteína. A Figura 13C mostra o comportamento de seus valores com a variação da concentração de KCl e de α-la. Pela superfície, mantendo as quantidades de nanoproteína e de KCl proporcionais, conforme o delineamento, maior será o valor de adesividade obtida. Mantendo valores máximos de KCl e mínimos de nanoproteína os valores de adesividade são menores e o comportamento é similar quando observados pontos com valores mínimos de KCl e máximos de nanoproteína.

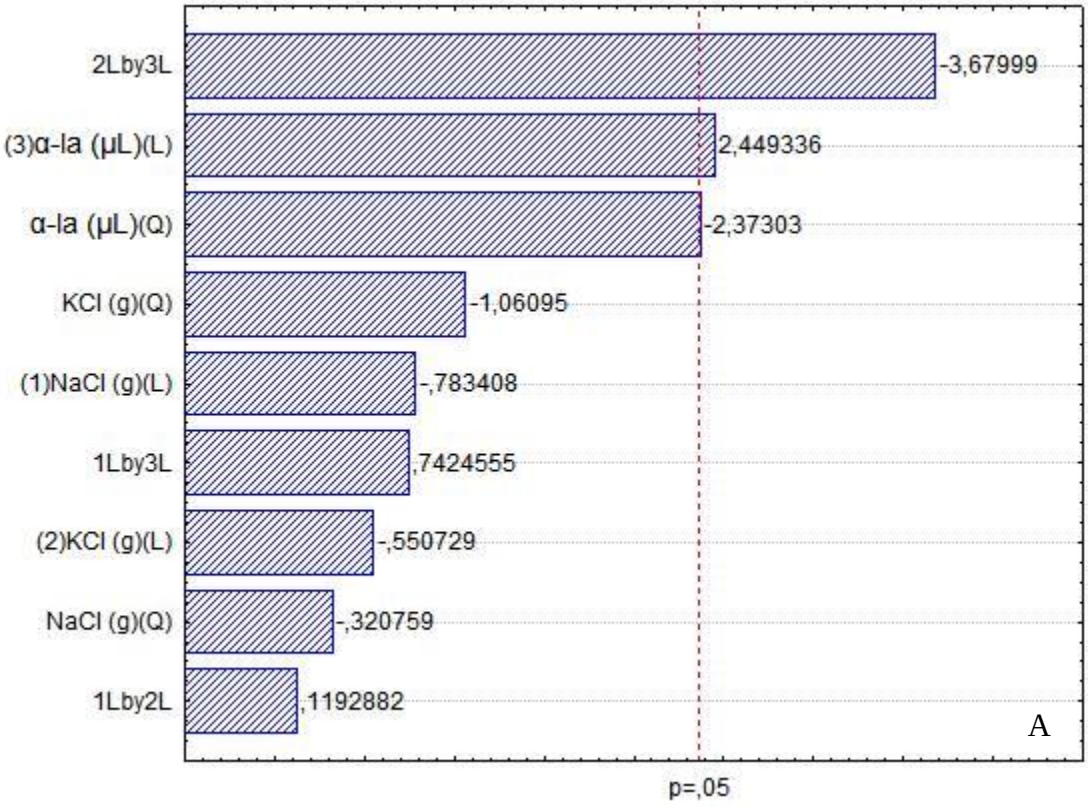
As equações 6 e 7 representam a modelagem encontrada para a resposta da adesividade em relação à figura 11B e 11C, respectivamente.

$$z = 3{,}2002 - 48{,}9197x - 18{,}2123x^2 + 55{,}7302y - 27{,}4876y^2\ 81{,}6763xy \qquad (6)$$

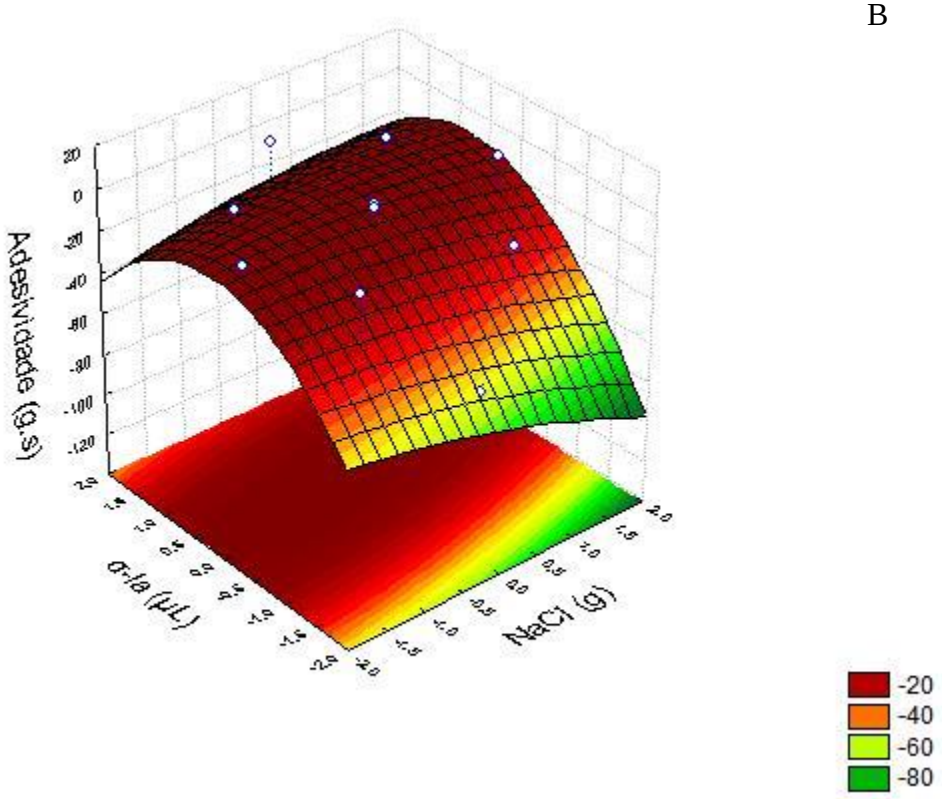
$$z = 3{,}2002 - 43{,}4655x - 21{,}5576x^2 + 55{,}7302y - 27{,}4876y^2 - 97{,}3343xy \qquad (7)$$

Figura 13. Análises estatística da influência das variáveis independentes nas respostas da variável dependente adesividade dos queijos minas frescal. A) Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados com 17 corridas e 3 fatores. B) Superfície de resposta 3D tendo como variáveis independentes a massa de NaCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de

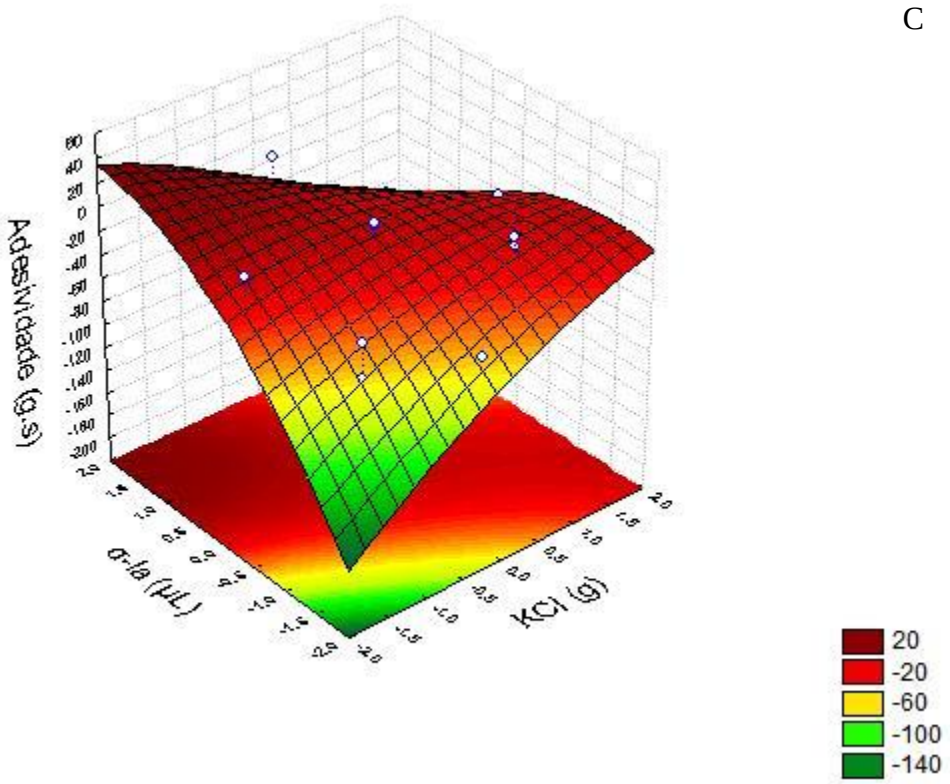
queijo. C) Superfície de resposta 3D tendo como variáveis independentes a massa de KCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo.



B



C



O Na^{+} quando presente no queijo faz trocas iônicas com o Ca^{+2} coloidal melhorando sua dissolução, alterando a formação da rede proteica de caseína por meio da hidratação da proteína, emulsão e estabilização da gordura (GUINEE, 2004). Por outro lado a adição de KCl provoca o endurecimento da massa e diminui a pressão osmótica quando proporcionalmente maior do que o NaCl os íons K^{+} em concentrações mais alta causa desequilíbrio na relação entre Na^{+}/Ca^{2+} diminuindo a eficiência da proteólise da caseína (FERRÃO; SILVA; SILVA; SILVA *et al.*, 2016). Sugere-se que a presença da nanoproteína complexe o $Na^{+,}$ aumentando a proporção de KCl em relação ao NaCl, o que também irá atrapalhar a proteólise da caseína e formação da massa.

Os queijos de BURITI; DA ROCHA; ASSIS e SAAD (2005) tiveram adesividade mais alta, de -0,178 ± 0,041 N·s no dia 1 de armazenamento e no dia 21 de armazenamento a adesividade foi de -0,080 ± 0,046 N.s. Para os queijos de FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) a adesividade obtida foi de -0,09 ± 0,12 N.s, no dia 1 de armazenamento, no 28º dia a adesividade diminuiu para -0,26 ± 0,07. Portanto, como os trabalhos citados mostram a variação da adesividade com o tempo pode-se concluir que, a além da formulação, dos queijos o tempo de maturação varia a adesividade. Isso é possível devido as reações que ocorrem durante a maturação do queijo dependente das condições externas e dos componentes internos (FOX; UNIACKE-LOWE; MCSWEENEY; O'MAHONY, 2015a).

A elasticidade dos queijos do DCCR variou entre 0,7122 e 0,8268 os valores foram próximos entre si. Esse parâmetro representa a capacidade de retorno a posição original após a compressão (CHEN; LARKIN; CLARK; IRWIN, 1979). A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % analisando o parâmetro Elasticidade mostrou que houve uma combinação linear entre KCl e nano α-la influenciaram na resposta de forma significativa. Os valores de F calculado de 17,5017 foi maior do que o F tabelado de 2,736, sendo assim a metodologia foi estatisticamente significativa. Pelo gráfico de Pareto a combinação linear entre KCl e α-la ultrapassou a linha de significância com valor de p = 0,05.

Quando comparado com o controle, os valores de elasticidade foram próximos em uma faixa de ±10 %. Portanto, pode-se dizer que as variações das variáveis independentes alteraram a elasticidade dos queijos. Por ser um queijo de massa mole, não elástico e não rígido, é interessante manter os parâmetros de elasticidade mesmo com a adição da nano α-la. Então, os resultados deste trabalho foram satisfatórios.

BURITI; DA ROCHA; ASSIS e SAAD (2005) encontraram valores de elasticidade semelhantes a este trabalho, de 0,882 ± 0,012 para queijo minas frescal no primeiro dia de armazenamento, sem alterações durante o tempo. Os queijos analisados por FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) apresentaram elasticidade de 1,01, também sem alterações após 28 dias de maturação. Em trabalho publicado por BURITI; DA ROCHA e SAAD (2005) após um dia de maturação a elasticidade foi de 0,903 ± 0,010, sem alteração com o tempo após 21 dias de maturação. Portanto, apesar das diferentes formas de produção e tempo de armazenamento a elasticidade do queijo se mantem no padrão, como sendo um produto de massa mole e não elástica. Apesar de o delineamento apresentar uma contribuição da nanoproteína do KCl para a resposta da elasticidade, os valores estão na faixa encontrada na literatura, portanto não é uma alteração significativa para a característica final do produto.

A Tabela 19 mostra os valores de firmeza e mastigabilidade dos 17 ensaios do delineamento e dos 9 pontos de controle. A firmeza representa a força necessária para penetrar o queijo com os dentes molares (CHEN; LARKIN; CLARK; IRWIN, 1979). Os valores de firmeza variaram conforme a formulação dos queijos, quando comparado com o controle os valores também foram diferentes. Portanto, as diferentes concentrações de sais e a presença da nanoproteína altera a dureza dos queijos. Entretanto os valores são baixos, o que é característico de queijo minas frescal.

A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % mostra que nenhuma variável independente foi significativa nas respostas da dureza (N) dos queijos. Pelo gráfico de Pareto com p = 0,05 nenhuma combinação ultrapassou a linha de significância.

Na literatura foram encontrados valores de dureza menores do que os obtidos neste trabalho. DAGOSTIN; CARPINE e MASSON (2013) encontraram valores de dureza de 1,22 ± 0,06 N. Para FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) os valores de dureza foi de 2,99 ± 0,39 N. BURITI; DA ROCHA; ASSIS e SAAD (2005) encontraram dureza de 4,28 ± 0,80 N. Em todos os trabalhos descritos, os autores observaram que a dureza aumentou com o tempo de maturação.

Além de diferentes métodos para a quantificação da dureza outros fatores contribuem para a variação do parâmetro, como teor de gordura e pH. O alto teor de gordura dificulta as interações entre as proteínas que formam a massa (DAGOSTIN; CARPINE; MASSON, 2013). Esse comportamento não foi observado neste trabalho. As nano α-la não influenciaram na formação de gordura da massa.

A mastigabilidade representa o tempo para mastigar os queijos a uma taxa constante de forma até reduzir a uma consistência adequada para deglutição (CHEN; LARKIN; CLARK; IRWIN, 1979). É de interesse deste trabalho uma mastigabilidade média, pois não é de interesse que o queijo se desintegre rapidamente na boca ou que demore demais.

Os valores de mastigabilidade obtidos no DCCR variaram entre 8,3383 e 65,4606. A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % para a Mastigabilidade não apresentou contribuição significativa das variáveis independentes. Nenhum parâmetro apresentou contribuição pelo teste de Pareto com p = 0,05.

Quando comparado com o controle, é possível observar que os queijos tiveram valores diferentes para a mastigabilidade. As alterações podem ser erros experimentais, sensibilidade do equipamento. Não são variações significativas que alteram drasticamente as propriedades sensoriais finais do queijo.

Na literatura foram encontrados valores de dureza menores do que os obtidos neste trabalho. DAGOSTIN; CARPINE e MASSON (2013) encontraram valores de mastigabilidade de 0,25 ± 0,04 N. Para FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) os valores de mastigabilidade foi de 1,99 ± 0,24 N. e eles observaram que a mastigabilidade aumentou com o tempo de maturação. Este mesmo comportamento de aumento da mastigabilidade com o tempo foi observado por BURITI; DA ROCHA; ASSIS e SAAD (2005). Em trabalho

publicado por BURITI; DA ROCHA e SAAD (2005) a mastigabilidade encontrada foi de 1,71 ± 0,14.

Tabela 19. Resultados obtidos na análise de perfil de textura realizada no Texturômetro seguindo os ensaios do delineamento e os pontos de controle, apresentando os valores de Dureza (N) e Mastigabilidade (N).

Ensaio	Firmeza (N)		Mastigabilidade (N)	
	Queijo com nanoestrutura	**Queijo Controle**	**Queijo com nanoestrutura**	**Queijo Controle**
1	75,6654	83,158	37,7953	50,575
2	79,9033	92,162	36,5194	35,353
3	28,2058	91,729	7,4400	35,419
4	51,8485	72,463	25,7644	29,954
5	68,0919	84,842	26,4694	34,025
6	64,8852	90,244	23,9523	45,010
7	52,7219	78,520	17,6448	35,942
8	48,4398	114,781	21,9829	54,440
9	157,7382	153,845	62,9771	62,626
10	83,9440		21,2555	
11	83,2075		42,6737	
12	36,9047		21,4881	
13	34,0941		8,3383	
14	70,7770		42,2336	
15	63,7494		35,5138	
16	52,6127		26,1776	
17	58,9156		23,0709	

A Tabela 20 mostra os valores de resiliência e de coesividade. Os valores da resiliência se mantiveram próximos e não apresentaram diferença em uma faixe de ±10 %, portanto os queijos mantiveram a resiliência apesar das variações de sais e nanoproteína. Não existe na literatura até o momento trabalhos que apresentam a resiliência de queijo minas frescal. A Resiliência não foi afetada por nenhuma variável dependente conforme ANOVA com intervalo de confiança de 95 % de pelo Pareto.

A coesividade dos queijos do DCCR variou entre 0,3704 e 0,7058, quando comparado com o controle não há diferença entre os valores em uma faixa de ±10 %, isso pode ser explicado pelo erro intrínseco do equipamento e da produção do queijo. Esse parâmetro representa a tendência das moléculas em se manterem unidas, dando o grau de deformação antes de se romper (CHEN; LARKIN; CLARK; IRWIN, 1979). A ANOVA com intervalo de confiança de 95 % e o gráfico de Pareto com p = 0,05 da coesividade mostraram que esse parâmetro não sofreu influência de nenhuma variável independente isolada ou entre a combinação.

Esses valores de coesividade é encontrado em outros trabalhos de queijo minas frescal. BURITI; DA ROCHA e SAAD (2005) obteve coesividade de 0,725 ± 0,015, BURITI; DA ROCHA; ASSIS e SAAD (2005) encontrou valor de 0,771 ± 0,006 e FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; AMBONI *et al.* (2010) encontrou coesividade de 0,66 ± 0,01. Portanto, a coesividade dos queijos obtidos neste trabalho, estão dentro dos parâmetros encontrados para queijo minas frescal. Sendo assim, a alteração das variáveis independentes não provoca mudanças na tendência das moléculas em manter-se juntas.

Tabela 20. Resultados obtidos na análise de perfil de textura realizada no Texturômetro seguindo os ensaios do delineamento e os pontos de controle apresentando os valores de Resiliência e Coesividade.

Ensaio	Resiliência (adimensional)		Coesividade (adimensional)	
	Queijo com nanoestrutura	**Queijo Controle**	**Queijo com nanoestrutura**	**Queijo Controle**
1	0,2549	0,378	0,6086	0,738
2	0,2371	0,210	0,5568	0,488
3	0,0970	0,228	0,3704	0,470
4	0,2816	0,236	0,6907	0,521
5	0,2203	0,230	0,5159	0,536
6	0,2029	0,252	0,5005	0,608
7	0,1781	0,255	0,4468	0,574
8	0,2347	0,280	0,5852	0,619
9	0,1989	0,218	0,4660	0,466
10	0,2856		0,6627	
11	0,3161		0,6388	
12	0,3539		0,7058	

13	0,1289	0,3396
14	0,3328	0,7014
15	0,3121	0,6809
16	0,3114	0,6638
17	0,2116	0,5055

Para fins de comparação da análise de perfil de textura (TPA) foram selecionados trabalhos com queijo minas frescal. As diferenças encontradas nos valores deste trabalho e da literatura pode ter como fonte a diferença metodológica do TPA. A Tabela 21 resume como foi elaborado o queijo e os parâmetros da técnica de TPA.

Tabela 21. Referências de queijo minas frescal com resultados de TPA descrevendo o tipo de queijo e os parâmetros básicos para a análise de textura.

Trabalho	Queijo analisado	Parâmetros do TPA
BURITI; DA ROCHA; ASSIS e SAAD (2005)	Queijo Minas Frescal com cultura lática: Lactococcus lactis subsp. lactis e Lactococcus lactis subsp. cremoris	TA-XT2. Velocidade da ponteira de 2 mm·s^{-1}, temperatura 25 ºC e 20 % de compressão.
BURITI; DA ROCHA e SAAD (2005)	Queijo Minas Frescal com cultura lática: Lactobacillus acidophilus	TA-XT2. Velocidade da probe de 2 mm·s^{-1}, temperatura 25 ºC e 20 % de compressão.
DAGOSTIN; CARPINE e MASSON (2013)	Queijo Minas Frescal não acidificado	Brookfield CT3 Texture Analyzer. Velocidade da probe 0,5 mm·s^{-1}, temperatura de 7 ºC e 35% de compressão.
FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO e PRUDÊNCIO (2010)	Queijo acidificado com cultura probiótica	TA-XT2. Velocidade da probe de 2,0 mm·s^{-1}, tempo de 5 s e temperatura de 5 ºC

A escolha do processo otimizado seguiu critérios estabelecidos relacionando o TPA com as análises físico-químicas. Como apenas a condutividade apresentou influência significativa pela ANOVA e não é essencial, os parâmetros de TPA foram mais importantes para a escolha do método.

Como o queijo minas frescal é um queijo úmido e de massa crua não maturada é desejável valores baixos de firmeza, o que foi atingido pelos testes de TPA. Os demais parâmetros que não foram influenciados pela metodologia, independente da escolha da produção otimizada, espera-se que fiquem dentro do padrão adequado para *minas frescal* como indicam os resultados.

Portanto, pelas análises da superfície de respostas obtidos no DCCR o protocolo de queijo otimizado norteado pelo objetivo de manter os parâmetros físico-químicos e de textura foi: sem adição de KCl (0,0 g, -α), o mínimo de NaCl utilizado no delineamento (2,5 g, -1) e o volume máximo de nano α-la (292,0 µL).

5.7. Queijo minas frescal com bioativos nano encapsulados

A Tabela 22 mostra os resultados das análises físico-químicas e de perfil de textura dos queijos produzidos seguindo metodologia otimizada e substituindo a proteína nanoestrutura pura por bioativos encapsulados, de acordo com os resultados escolhidos de encapsulação de bioativos. Tanto o queijo com quercetina (QQ) quanto o queijo com vitamina B2 (QV) mantiveram os parâmetros físico-químicos semelhantes aos demais queijos comparando os com resultados da Tabela 18 e 19. Sendo assim, a presença da nanocápsula proteica nos queijos não alterou suas características físico-químicas.

Quanto as análises de perfil de textura TPA a adição de bioativos encapsulados não alterou os resultados dos parâmetros estudados. Os resultados obtidos para os queijos com os bioativos estão próximos aos obtidos para os queijos nanoestruturados produzidos seguindo delineamento experimental do tipo DCCR.

Esse resultado era esperado conforme ocorreu nos queijos estudados pelo planejamento experimental DCCR. Além disso, a adição de um componente de baixa massa molecular não provoca alterações significativas na estrutura do queijo ou nas propriedades físico-químicas. São outros fatores que alteram como o por exemplo o tempo de maturação e presença de bactérias lácticas (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2013).

De modo geral, não houve alterações drásticas nas propriedades estudas, assim foi possível desenvolver queijo tipo *minas frescal* com bioativos encapsulados em proteína α-la

nanoestruturada. Alterações demais nas propriedades dos queijos pode levar a não aceitação pelo consumidor. Com a inserção dessa tecnologia foi possível desenvolver um queijo *minas frescal* nanoestruturado nutracêutico e funcional.

Tabela 22. Resultados das análises físico-químicas (FQ) e de perfil de textura (TPA) para os queijos otimizados com adição de quercetina (QQ) e vitamina B2 (QV) encapsulados em α-la nanoestruturada.

	QQ	**QV**
Adesividade (g.s)	-25,54 ± 15,62	-60,38 ± 0,7,55
Elasticidade	0,75 ± 0,05	0,73 ± 0,02
Mastigabilidade	11,81 ± 1,70	8,13 ± 0,11
Firmeza (N)	23,46 ± 1,62	22,42 ± 1,10
Coesividade	0,65 ± 0,11	0,46 ± 0,06
Resiliência	0,22 ± 0,03	0,19 ± 0,00
pH	6,81 ± 0,03	7,00 ± 0,26
Acidez Titulável	0,09 ± 0,01	0,13 ± 0,00
Sólidos Solúveis	3,54 ± 0,34	3,63 ± 0,26
Condutividade	1439,00 ± 58,13	1451,33 ± 103,00

6. Conclusão

O processo de nanoestruturação de α-lactalbumina por auto associação pela alteração da força iônica da solução resultou nanoestruturas dentro da faixa de raio hidrodinâmico para ser considerada nanotecnologia. A metodologia foi simples e rápida e possibilitou a obtenção de um novo material com propriedades tecno-funcionais, como espuma e emulsão, melhores quando comparada com as propriedades da proteína nativa. Sem alteração das propriedades térmicas. Devido as características anfifóteras da proteína, foi possível encapsular a quercetina, uma molécula hidrofóbica e a vitamina B2.

A eficiência de encapsulação e a capacidade de ligação da quercetina em nano α-la pura foi superior quando comparada ao sistema da proteína nativa. De modo contrário, a proteína nativa encapsulou melhor a vitamina B2. Isso segure que a nanoestruturação da α-la expõe mais sítios hidrofóbicos. O estudo da liberação controlada in vitro simulando fluido gastrointestinal feita com os encapsulados mostra que a α-la nanoestruturada e nativa controla a liberação dos bioativos, porém, a liberação ocorre totalmente em fluido gástrico.

O planejamento experimental do tipo DCCR utilizado para a produção de queijo minas frescal possibilitou a compreensão estatista do que ocorre com os queijos com diferentes massas de sais (NaCl e KCl) e a presença de nano α-pura. Não houve alteração no pH, acidez titulável, sólidos solúveis, firmeza, mastigabilidade, elasticidade, coesividade e resiliência. Foi

determinado o ponto ótimo para a produção de queijos com bioativos nanoestruturados. Os resultados das análises físico-químicas e de perfil de textura foram adequados e dentro dos parâmetros para queijo minas frescal. Sendo uma tecnologia que possibilita a produção de um alimento nutracêutico. Além disso, os dados gerados poderão ser base para futuros estudos de análise sensorial e aceitação de consumidor de queijos com nanoestruturas e com menor teor de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA, N. P.; MACEDO, A. S.; DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B. *et al.* Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). **LWT - Food Science and Technology**, 59, n. 1, p. 115-121, 2014/11/01/ 2014.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, 18, n. 1, p. 75-81, 2002/01/01/ 2002.

AKBARI-ALAVIJEH, S.; SHADDEL, R.; JAFARI, S. M. Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, 105, p. 105774, 2020/08/01/ 2020.

ALEXANDER, M.; DALGLEISH, D. G. Dynamic Light Scattering Techniques and Their Applications in Food Science. **Food Biophysics**, 1, n. 1, p. 2-13, 2006/03/01 2006.

ARROYO-MAYA, I. J.; RODILES-LÓPEZ, J. O.; CORNEJO-MAZÓN, M.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. *et al.* Effect of different treatments on the ability of α-lactalbumin to form nanoparticles. **Journal of Dairy Science**, 95, n. 11, p. 6204-6214, 2012/11/01/ 2012.

BACHER, A.; EBERHARDT, S.; FISCHER, M.; KIS, K. *et al.* Biosynthesis of Vitamin B2 (Riboflavin). **Annual Review of Nutrition**, 20, n. 1, p. 153-167, 2000/07/01 2000.

BENKERROUM, N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. **International Journal of Dairy Technology**, 63, n. 3, p. 320-338, 2010/08/01 2010. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00584.x.

BHUSHAN, B. Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education. *In*: WINKELMANN, K. e BHUSHAN, B. (Ed.). **Global Perspectives of Nanoscience and Engineering Education**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1-31.

BIANCHI, J. R. d. O.; SCHLOGL, A. E.; SANTOS, I. J. B.; JUNIOR, Ê. N. O. *et al.* Influência do revestimento de goma tara com nano$CaCO_3$ na maturação da goiaba no pós-colhieta. **Anais do II Simpósio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**, 2, p. 24-27, 07/13/2019 2019. Trabalho completo em Anais de Simpósio.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, 31, n. 2, p. 118-129, 2013/06/01/ 2013.

BOGGIONE SANTOS, I. J.; HERNANDEZ HERNANDEZ, H. L.; CARDOSO COSTA, M. H.; DE QUEIROZ LAFETÁ, J. A. *et al.* Conjugates of α-lactalbumin, β-lactoglobulin, and lysozyme with polysaccharides: Characterization and techno-functional properties. **Food Research International**, 116, p. 492-498, 2019/02/01/ 2019.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, 585, n. 2, p. 325-337, 2008/05/13/ 2008.

BURITI, F. C. A.; DA ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of Lactobacillus paracasei. **LWT - Food Science and Technology**, 38, n. 2, p. 173-180, 2005/03/01/ 2005.

BURITI, F. C. A.; DA ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005/12/01/ 2005.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, 18, n. 3, p. 262-267, 2007/03/01/ 2007.

CHAVOSHPOUR-NATANZI, Z.; SAHIHI, M. Encapsulation of quercetin-loaded β-lactoglobulin for drug delivery using modified anti-solvent method. **Food Hydrocolloids**, 96, p. 493-502, 2019/11/01/ 2019.

CHEN, A. H.; LARKIN, J. W.; CLARK, C. J.; IRWIN, W. E. Textural Analysis of Cheese. **Journal of Dairy Science**, 62, n. 6, p. 901-907, 1979/06/01/ 1979.

CHRYSINA, E. D.; BREW, K.; ACHARYA, K. R. Crystal Structures of Apo- and Holo-bovine α-Lactalbumin at 2.2-Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions *. **Journal of Biological Chemistry**, 275, n. 47, p. 37021-37029, 2000.

COGSWELL, M. E.; MUGAVERO, K.; BOWMAN, B. A.; FRIEDEN, T. R. Dietary Sodium and Cardiovascular Disease Risk--Measurement Matters. **The New England journal of medicine**, 375, n. 6, p. 580-586, 2016.

D'ONOFRE COUTO, B.; NOVAES DA COSTA, R.; CASTRO LAURINDO, W.; MORAES DA SILVA, H. *et al.* Characterization, techno-functional properties, and encapsulation efficiency of self-assembled β-lactoglobulin nanostructures. **Food Chemistry**, 356, p. 129719, 2021/09/15/ 2021.

DA SILVA, C. R. T.; SANTOS, I. J. B.; BIANCHI, J. R. d. O.; LEITE, L. C. *et al.* Nanosensor colorimétrico para a determinação do agrotóxico glifosato. **XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 5490-5495, 2018 2018. Trabalho Completo em Anais de Congresso.

DAGOSTIN, J. L. A.; CARPINE, D.; MASSON, M. L. Influence of Acidification Method on Composition, Texture, Psychrotrophs, and Lactic Acid Bacteria in Minas Frescal Cheese. **Food and Bioprocess Technology**, 6, n. 11, p. 3017-3028, 2013/11/01 2013.

DANTAS, A. B.; JESUS, V. F.; SILVA, R.; ALMADA, C. N. *et al.* Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with Lactobacillus casei Zhang. **Journal of Dairy Science**, 99, n. 1, p. 18-30, 2016/01/01/ 2016.

DE SOUZA, M. S.; BIANCHI, J. R. d. O.; SANTOS, I. J. B. Análise Físico-química da banana para validação da eficiência de um revestimento de goma tara com nanopartículas de prata. **Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Ciência de Tecnologia de Alimentos**, p. 2253-2258, 2018 2018. Trabalho completo em Anais de Congresso.

DELAVARI, B.; SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; GHASEMI, A. *et al.* Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. **Food Hydrocolloids**, 45, p. 124-131, 2015/03/01/ 2015.

DESMET, J.; HANSSENS, I.; VAN CAUWELAERT, F. Comparison of the binding of Na+ and Ca2+ to bovine α-lactalbumin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 912, n. 2, p. 211-219, 1987/04/08/ 1987.

DJOULLAH, A.; SAUREL, R. Controlled release of riboflavin encapsulated in pea protein microparticles prepared by emulsion-enzymatic gelation process. **Journal of Food Engineering**, 292, p. 110276, 2021/03/01/ 2021.

DOYON, M.; LABRECQUE, J. Functional foods: a conceptual definition. **British Food Journal**, 110, n. 11, p. 1133-1149, 2008.

DU, Y.; BAO, C.; HUANG, J.; JIANG, P. *et al.* Improved stability, epithelial permeability and cellular antioxidant activity of β-carotene via encapsulation by self-assembled α-lactalbumin micelles. **Food Chemistry**, 271, p. 707-714, 2019/01/15/ 2019.

DUCE, C.; DELLA PORTA, V.; BRAMANTI, E.; CAMPANELLA, B. *et al.* Loading of halloysite nanotubes with BSA,α-Lac andβ-Lg: a Fourier transform infrared spectroscopic and thermogravimetric study. **Nanotechnology**, 28, n. 5, p. 055706, 2016/12/28 2016.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; BENSENOR, I. M. *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação %J Revista de Saúde Pública. 46, p. 126-134, 2012.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 363, n. 1, p. 1-24, 2011/11/01/ 2011.

Editorial: Sustainable Nanotechnology. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 2, n. 7, p. 1543-1544, 2014/07/07 2014.

ELLOUZE, M.; VIAL, C.; ATTIA, H.; AYADI, M. A. Camel α−lactalbumin at the oil−water interface: Effect of pH and heat treatment on the structure, surface characteristics and emulsifying properties. **LWT**, 116, p. 108550, 2019/12/01/ 2019.

FERRÃO, L. L.; SILVA, E. B.; SILVA, H. L. A.; SILVA, R. *et al.* Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. **Food Research International**, 86, p. 93-102, 2016/08/01/ 2016.

FERRARI, C. K. B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**, 5, n. 5, p. 275-289, 2004/10/01 2004.

FERREIRA, L. T.; ALARCON, R. T.; PERPÉTUO, G. L.; BANNACH, G. Investigation and characterization by TG/DTG–DTA and DSC of the fusion of Riboflavin, and its interaction with the antibiotic norfloxacin in the screening of cocrystal. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 136, n. 2, p. 581-588, 2019/04/01 2019.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. Chemistry and Biochemistry of Cheese. *In*: FOX, P. F.;UNIACKE-LOWE, T.*, et al* (Ed.). **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Cham: Springer International Publishing, 2015a. p. 499-546.

FOX, P. F.; UNIACKE-LOWE, T.; MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A. Milk Proteins. *In*: FOX, P. F.;UNIACKE-LOWE, T.*, et al* (Ed.). **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Cham: Springer International Publishing, 2015b. p. 145-239.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; AMBONI, R. D. D. M. C. *et al.* The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, 63, n. 4, p. 561-568, 2010/11/01 2010. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00617.x.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, 96, n. 4, p. 621-627, 2010/02/01/ 2010.

GAO, Y.; JIN, B.; SHEN, W.; SINKO, P. J. *et al.* China and the United States—Global partners, competitors and collaborators in nanotechnology development. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 12, n. 1, p. 13-19, 2016/01/01/ 2016.

GHAANI, M.; NASIRIZADEH, N.; YASINI ARDAKANI, S. A.; MEHRJARDI, F. Z. *et al.* Development of an electrochemical nanosensor for the determination of gallic acid in food. **Analytical Methods**, 8, n. 5, p. 1103-1110, 2016. 10.1039/C5AY02747K.

GRAVELAND-BIKKER, J. F.; IPSEN, R.; OTTE, J.; DE KRUIF, C. G. Influence of Calcium on the Self-Assembly of Partially Hydrolyzed α-Lactalbumin. **Langmuir**, 20, n. 16, p. 6841-6846, 2004/08/01 2004.

GRUÈRE, G. P. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries. **Food Policy**, 37, n. 2, p. 191-198, 2012/04/01/ 2012.

GUINEE, T. P. Salting and the role of salt in cheese. **International Journal of Dairy Technology**, 57, n. 2-3, p. 99-109, 2004/05/01 2004. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00145.x.

GULZAR, M.; BOUHALLAB, S.; JARDIN, J.; BRIARD-BION, V. *et al.* Structural consequences of dry heating on alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin at pH 6.5. **Food Research International**, 51, n. 2, p. 899-906, 2013/05/01/ 2013.

GUPTA, N.; SRIVASTAVA, A. K.; PANDEY, V. N. Biodiversity and Nutraceutical Quality of Some Indian Millets. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, 82, n. 2, p. 265-273, 2012/06/01 2012.

HAMAD, H. T.; AL-SHARIFY, Z. T.; AL-NAJJAR, S. Z.; GADOOA, Z. A. A review on nanotechnology and its applications on Fluid Flow in agriculture and water recourses. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, 870, p. 012038, 2020/07/18 2020.

HAO, J.; GUO, B.; YU, S.; ZHANG, W. *et al.* Encapsulation of the flavonoid quercetin with chitosan-coated nano-liposomes. **LWT - Food Science and Technology**, 85, p. 37-44, 2017/11/01/ 2017.

HATAKEYAMA, T.; NAKAMURA, K.; HATAKEYAMA, H. Determination of bound water content in polymers by DTA, DSC and TG. **Thermochimica Acta**, 123, p. 153-161, 1988/01/15/ 1988.

HERNÁNDEZ, H. L. H.; SANTOS, I. J. B.; OLIVEIRA, E. B. d.; TEÓFILO, R. F. *et al.* Nanostructured conjugates from tara gum and α-lactalbumin. Part 1. Structural characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 153, p. 995-1004, 2020/06/15/ 2020.

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015/12/01 2015.

IAVICOLI, I.; LESO, V.; BEEZHOLD, D. H.; SHVEDOVA, A. A. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 329, p. 96-111, 2017/08/15/ 2017.

IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, 354, n. 6348, p. 56-58, 1991/11/01 1991.

IPSEN, R.; OTTE, J. Self-assembly of partially hydrolysed α-lactalbumin. **Biotechnology Advances**, 25, n. 6, p. 602-605, 2007/11/01/ 2007.

IQBAL, P.; PREECE, J. A.; MENDES, P. M. Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *In*: **Supramolecular Chemistry**, 2012.

IRAVANI, S.; KORBEKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical sciences**, 9, n. 6, p. 385-406, Nov-Dec 2014.

JONES, D.; CABALLERO, S.; DAVIDOV-PARDO, G. Chapter Six - Bioavailability of nanotechnology-based bioactives and nutraceuticals. *In*: LIM, L.-T. e ROGERS, M. (Ed.). **Advances in Food and Nutrition Research**: Academic Press, 2019. v. 88, p. 235-273.

JUSTO-HANANI, R.; DAYAN, T. European risk governance of nanotechnology: Explaining the emerging regulatory policy. **Research Policy**, 44, n. 8, p. 1527-1536, 2015/10/01/ 2015.

KALRA, E. K. Nutraceutical-definition and introduction. **AAPS PharmSci**, 5, n. 3, p. 27-28, 2003/09/01 2003.

KARIMI, R.; AMIR MOHAMMAD, M.; ADRIANO GOMES DA, C. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy science & technology**, 91, n. 3, p. 283-308, 2011.

KHARE, A. R.; VASISHT, N. Chapter 14 - Nanoencapsulation in the Food Industry: Technology of the Future. *In*: GAONKAR, A. G.;VASISHT, N.*, et al* (Ed.). **Microencapsulation in the Food Industry**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 151-155.

KIMPEL, F.; SCHMITT, J. J. Review: Milk Proteins as Nanocarrier Systems for Hydrophobic Nutraceuticals. **Journal of Food Science**, 80, n. 11, p. R2361-R2366, 2015/11/01 2015. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13096.

LABROO, P.; CUI, Y. Flexible graphene bio-nanosensor for lactate. **Biosensors and Bioelectronics**, 41, p. 852-856, 2013/03/15/ 2013.

LEITE, E. R.; RIBEIRO, C. Basic Principles: Thermodynamics and Colloidal Chemistry. *In*: LEITE, E. R. e RIBEIRO, C. (Ed.). **Crystallization and Growth of Colloidal Nanocrystals**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 7-17.

LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTAĆ, D. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, 40, p. 68-75, 2018/01/01/ 2018.

LIANG, J.; YAN, H.; YANG, H.-J.; KIM, H. W. *et al.* Synthesis and controlled-release properties of chitosan/β-Lactoglobulin nanoparticles as carriers for oral administration of epigallocatechin gallate. **Food Science and Biotechnology**, 25, n. 6, p. 1583-1590, 12 2016.

LIU, W.; KONG, Y.; YE, A.; SHEN, P. *et al.* Preparation, formation mechanism and in vitro dynamic digestion behavior of quercetin-loaded liposomes in hydrogels. **Food Hydrocolloids**, 104, p. 105743, 2020/07/01/ 2020.

MACK, M.; GRILL, S. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 71, n. 3, p. 265-275, 2006/07/01 2006.

MADALENA, D. A.; RAMOS, Ó. L.; PEREIRA, R. N.; BOURBON, A. I. *et al.* In vitro digestion and stability assessment of β-lactoglobulin/riboflavin nanostructures. **Food Hydrocolloids**, 58, p. 89-97, 7// 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H. *et al.* **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016. 8582712987.

MALEKI DIZAJ, S.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K. *et al.* Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. **Expert Opinion on Drug Delivery**, 12, n. 10, p. 1649-1660, 2015/10/03 2015.

MALHEIROS, P. d. S.; SANT'ANNA, V.; BARBOSA, M. d. S.; BRANDELLI, A. *et al.* Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on Listeria monocytogenes growth in Minas frescal cheese. **International Journal of Food Microbiology**, 156, n. 3, p. 272-277, 2012/06/01/ 2012.

MARINOVA, K. G.; BASHEVA, E. S.; NENOVA, B.; TEMELSKA, M. *et al.* Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: Sodium caseinate and whey protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, 23, n. 7, p. 1864-1876, 2009/10/01/ 2009.

MATSUNO, R.; ADACHI, S. Lipid encapsulation technology - techniques and applications to food. **Trends in Food Science & Technology**, 4, n. 8, p. 256-261, 1993/08/01/ 1993.

MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Cheese: Methods of Chemical Analysis. *In*: FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects**. Boston, MA: Springer US, 1993. p. 341-388.

MEHLA, R.; KUMARI, A.; DHANKHAR, J.; BUMBADIYA, M. *et al.* Whey: Importance and Techno-functional Applications. *In*: MINJ, J.;SUDHAKARAN V, A.*, et al* (Ed.). **Dairy Processing: Advanced Research to Applications**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 161-179.

MOHAMMADIAN, M.; WALY, M. I.; MOGHADAM, M.; EMAM-DJOMEH, Z. *et al.* Nanostructured food proteins as efficient systems for the encapsulation of bioactive compounds. **Food Science and Human Wellness**, 9, n. 3, p. 199-213, 2020/09/01/ 2020.

MOORE, J.; CERASOLI, E. Particle Light Scattering Methods and Applications. *In*: LINDON, J. C. (Ed.). **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2010. p. 2077-2088.

MOZURAITYTE, R.; BERGET, I.; MAHDALOVA, M.; GRØNSBERG, A. *et al.* Sodium reduction in processed cheese spreads and the effect on physicochemical properties. **International Dairy Journal**, 90, p. 45-55, 2019/03/01/ 2019.

MU, L.; SPRANDO, R. L. Application of Nanotechnology in Cosmetics. **Pharmaceutical Research**, 27, n. 8, p. 1746-1749, 2010/08/01 2010.

NIGEN, M.; CROGUENNEC, T.; BOUHALLAB, S. Formation and stability of α-lactalbumin–lysozyme spherical particles: Involvement of electrostatic forces. **Food Hydrocolloids**, 23, n. 2, p. 510-518, 2009/03/01/ 2009.

O'REGAN, J.; ENNIS, M. P.; MULVIHILL, D. M. 13 - Milk proteins. *In*: PHILLIPS, G. O. e WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)**: Woodhead Publishing, 2009. p. 298-358.

OMARA, T. Antibacterial activity of papain hydrolysates of isoelectrically-isolated casein and thermoprecipitated alpha-lactalbumin from bovine and caprine milk on diarrheagenic bacteria. 2018.

OTTE, J.; IPSEN, R.; BAUER, R.; BJERRUM, M. J. *et al.* Formation of amyloid-like fibrils upon limited proteolysis of bovine α-lactalbumin. **International Dairy Journal**, 15, n. 3, p. 219-229, 2005/03/01/ 2005.

PAULA, J. C. J. d.; CARVALHO, A. F. d.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. 64, n. 367, p. 7 %J Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2013. queijos; processamento; tecnologia.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 26, n. 3, p. 716-723, 1978/05/01 1978.

PEREIRA, I. d. O. **Análise e otimização do processo de ultrafiltração do soro de leite para produção de concentrado proteico**. 2009. -, Dissertação de Mestrado. Itapetinga: Programa de Pós-Graduação em Engenharia ….

PERMYAKOV, E. A.; BERLINER, L. J. α-Lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, 473, n. 3, p. 269-274, 2000/05/19/ 2000.

PLENTZ, F.; FAZZIO, A. Considerações sobre o Programa Brasileiro de Nanotecnologia %J Ciência e Cultura. 65, p. 23-27, 2013.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V. *et al.* Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, 38, n. 7, p. 592-607, 2017/07/01/ 2017.

RAFFA, V.; VITTORIO, O.; RIGGIO, C.; CUSCHIERI, A. Progress in nanotechnology for healthcare. **Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies**, 19, n. 3, p. 127-135, 2010/06/01 2010.

RASHIDI, L.; KHOSRAVI-DARANI, K. The Applications of Nanotechnology in Food Industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 51, n. 8, p. 723-730, 2011/09/01 2011.

RELKIN, P.; MULVIHILL, D. M. Thermal unfolding of β-lactoglobulin, α-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36, n. 6, p. 565-601, 1996/07/01 1996.

ROONEY, M. L. 5 - Introduction to active food packaging technologies. *In*: HAN, J. H. (Ed.). **Innovations in Food Packaging**. London: Academic Press, 2005. p. 63-79.

SAHOO, N. G.; KAKRAN, M.; SHAAL, L. A.; LI, L. *et al.* Preparation and Characterization of Quercetin Nanocrystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 100, n. 6, p. 2379-2390, 2011/06/01/ 2011.

SALGADO, J. **Alimentos funcionais**. Oficina de Textos, 2016. 8579752892.

SANTOS, I. J. B.; SARAIVA, C. S.; MONTEIRO, A. A.; DOS REIS COIMBRA, J. S. J. F. A. o. N. Application and Potential of Nanotechnology in Milk and Derivatives Processing Industry. p. 225, 2019.

SANTOS, J. R. M. P. d.; ALBERT, A. L. M.; LEANDRO, K. C. Importância de uma regulamentação específica com as definições e classificações dos produtos comercializados como suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos. **Revista de Direito Sanitário**, 19, n. 3, p. 54-67, 05/30 2019.

SAY, R.; KEÇILI, R.; BIÇEN, Ö.; ŞIŞMAN, F. Y. *et al.* A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. **Process Biochemistry**, 46, n. 8, p. 1688-1692, 2011/08/01/ 2011.

SCHMIDT, O. G.; DENEKE, C.; NAKAMURA, Y.; ZAPF-GOTTWICK, R. *et al.* Nanotechnology — Bottom-up Meets Top-down. *In*: KRAMER, B. (Ed.). **Advances in Solid State Physics**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002. p. 231-240.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, 20, n. 9, p. 376-387, 2009/09/01/ 2009.

SHARMA, P.; OEY, I.; EVERETT, D. W. Thermal properties of milk fat, xanthine oxidase, caseins and whey proteins in pulsed electric field-treated bovine whole milk. **Food Chemistry**, 207, p. 34-42, 2016/09/15/ 2016.

SILVA, A. C. C.; SILVA, N. A.; PEREIRA, M. C. S.; VASSIMON, H. J. R. C. C. Alimentos contendo ingredientes funcionais em sua formulação: revisão de artigos publicados em revistas brasileiras. 11, n. 2, p. 133-144, 2016.

SILVA, F. T. **Queijo minas frescal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa …, 2005. 857383305X.

SILVA, H. L. A.; BALTHAZAR, C. F.; ESMERINO, E. A.; NETO, R. P. C. *et al.* Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor enhancers on probiotic Prato cheese: A study covering manufacturing, ripening and storage time. **Food Chemistry**, 248, p. 192-200, 2018/05/15/ 2018.

SINGH, N. A. Nanotechnology Definitions, Research, Industry and Property Rights. *In*: RANJAN, S.;DASGUPTA, N.*, et al* (Ed.). **Nanoscience in Food and Agriculture 1**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 43-64.

SOM, C.; BERGES, M.; CHAUDHRY, Q.; DUSINSKA, M. *et al.* The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. **Toxicology**, 269, n. 2, p. 160-169, 2010/03/10/ 2010.

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, p. 012039, 2016/07 2016.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, 27, n. 2, p. 82-89, 2009/02/01/ 2009.

SPERRY, M. F.; SILVA, H. L. A.; BALTHAZAR, C. F.; ESMERINO, E. A. *et al.* Probiotic Minas Frescal cheese added with L. casei 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. **Journal of Functional Foods**, 45, p. 435-443, 2018/06/01/ 2018.

TARHAN, Ö.; TARHAN, E.; HARSA, Ş. Investigation of the structure of alpha-lactalbumin protein nanotubes using optical spectroscopy. **Journal of Dairy Research**, 81, n. 1, p. 98-106, 2014.

USKOKOVIĆ, V. Nanotechnologies: What we do not know. **Technology in Society**, 29, n. 1, p. 43-61, 2007/01/01/ 2007.

VAN AKEN, G. A.; MERKS, M. T. E. Adsorption of soluble proteins to dilating surfaces. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 114, p. 221-226, 1996/08/20/ 1996.

VANDERROOST, M.; RAGAERT, P.; DEVLIEGHERE, F.; DE MEULENAER, B. Intelligent food packaging: The next generation. **Trends in Food Science & Technology**, 39, n. 1, p. 47-62, 2014/09/01/ 2014.

VASHISTH, P.; SINGH, R. P.; PRUTHI, V. A controlled release system for quercetin from biodegradable poly(lactide-co-glycolide)–polycaprolactone nanofibers and its in vitro antitumor activity. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 31, n. 3, p. 260-272, 2016/05/01 2015.

VERMA, V.; SHARMA, P.; SHARMA, J.; KAUR LAMBA, A. *et al.* Development, characterization and solubility study of solid dispersion of Quercetin by solvent evaporation method. **Materials Today: Proceedings**, 4, n. 9, p. 10128-10133, 2017/01/01/ 2017.

WARME, P. K.; MOMANY, F. A.; RUMBALL, S. V.; TUTTLE, R. W. *et al.* Computation of structures of homologous proteins. Alpha-lactalbumin from lysozyme. **Biochemistry**, 13, n. 4, p. 768-782, Feb 12 1974.

WEISS, J. Functional Materials in Food Nanotechnology. **Journal of food science**, v. 71, n. no. 9, p. pp. R107-R116-2006 v.2071 no.2009, 2006-11 2006.

YEH, N.-C. Nanotechnology for electronics & photonics. **Technovation**, 33, n. 4, p. 108, 2013/04/01/ 2013.

ZHANG, M.; SWARTS, S. G.; YIN, L.; LIU, C. *et al.*, 2011, Boston, MA. **Antioxidant Properties of Quercetin**. Springer US. 283-289.

Apêndice A. Resultados de análises estatísticas dos ensaios físico-químicos dos queijos *minas frescal*.

Tabela A1. ANOVA tendo como variável dependente o pH sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	0,003344	1	0,003344	0,134728	0,724424
NaCl (Q)	0,006576	1	0,006576	0,264930	0,622602
(2)KCl (L)	0,014837	1	0,014837	0,597717	0,464751
KCl (Q)	0,018146	1	0,018146	0,731011	0,420852
(3) alfa-la (L)	0,039527	1	0,039527	1,592393	0,247403
Alfa-la (Q)	0,000068	1	0,000068	0,002747	0,959661
1L by 2L	0,000012	1	0,000012	0,000504	0,982723
1L by 3L	0,009112	1	0,009112	0,367104	0,563709
2L by 3L	0,006613	1	0,006613	0,266390	0,621662
Erro	0,173759	7	0,024823		
Total SS	0,270988	16			

Figura A1. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente o pH com 17 corridas e 3 fatores.

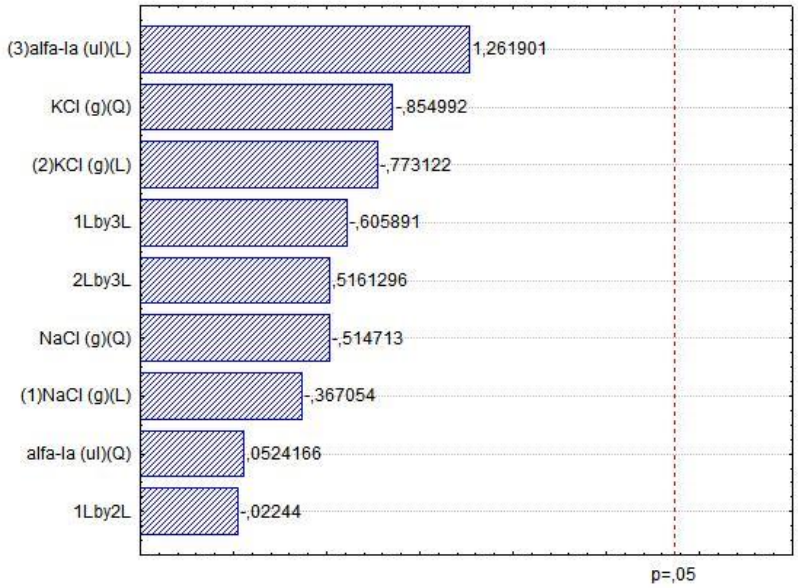


Tabela A2. ANOVA tendo como variável dependente a Acidez Titulável sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	69,62	1	69,621	0,039524	0,848065
NaCl (Q)	67,38	1	67,379	0,038251	0,850496
(2)KCl (L)	3950,64	1	3950,639	2,242773	0,177908
KCl (Q)	2670,97	1	2670,967	1,516305	0,257941
(3) alfa-la (L)	3,13	1	3,128	0,001776	0,967565
Alfa-la (Q)	64,48	1	64,483	0,036607	0,853699
1L by 2L	17,57	1	17,569	0,009974	0,923248
1L by 3L	1,19	1	1,194	0,000678	0,979958
2L by 3L	1008,91	1	1008,909	0,572756	0,473863
Erro	12330,48	7	1761,498		
Total SS	21005,87	16			

Figura A2. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente a Acidez Titulável com 17 corridas e 3 fatores

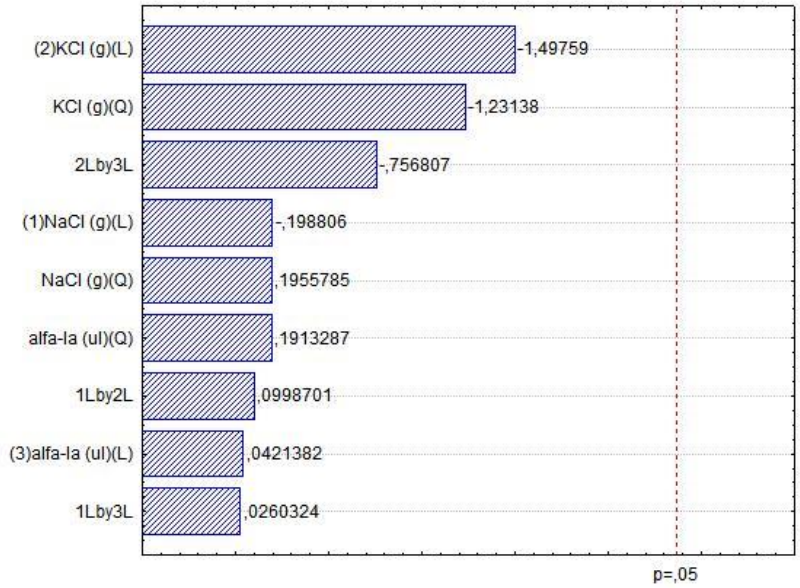


Tabela A3. ANOVA tendo como variável dependente os sólidos solúveis em º Brix sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	0,59534	1	0,595342	0,849663	0,387314
NaCl (Q)	1,56202	1	1,562017	2,229287	0,179054
(2)KCl (L)	0,03693	1	0,036934	0,052711	0,824976
KCl (Q)	1,05967	1	1,059673	1,512349	0,258506
(3) alfa-la (L)	1,76260	1	1,762604	2,515561	0,156748
Alfa-la (Q)	0,02184	1	0,021843	0,031174	0,864854
1L by 2L	1,05851	1	1,058513	1,510693	0,258743
1L by 3L	0,17701	1	0,177012	0,252629	0,630653
2L by 3	0,20161	1	0,201612	0,287738	0,608290
Erro	4,90476	7	0,700680		
Total SS	10,93726	16			

Figura A3. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente os Sólidos solúveis em ºBrix com 17 corridas e 3 fatores.

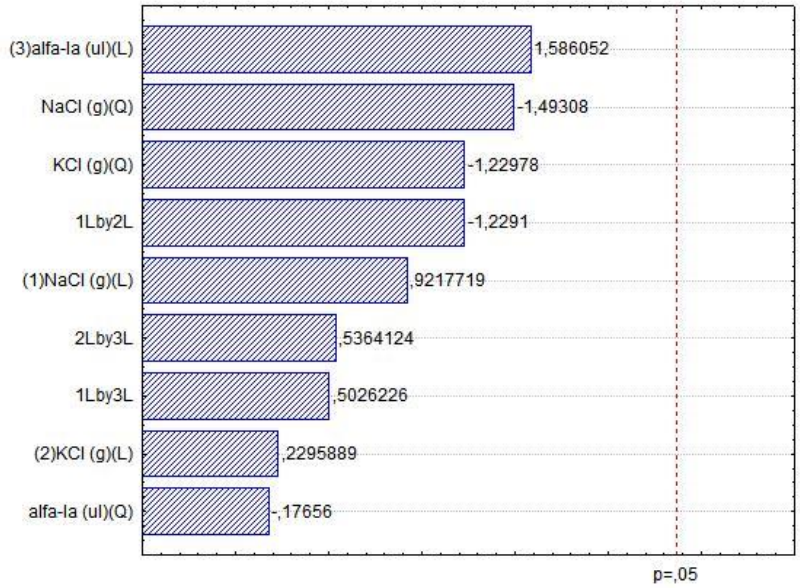


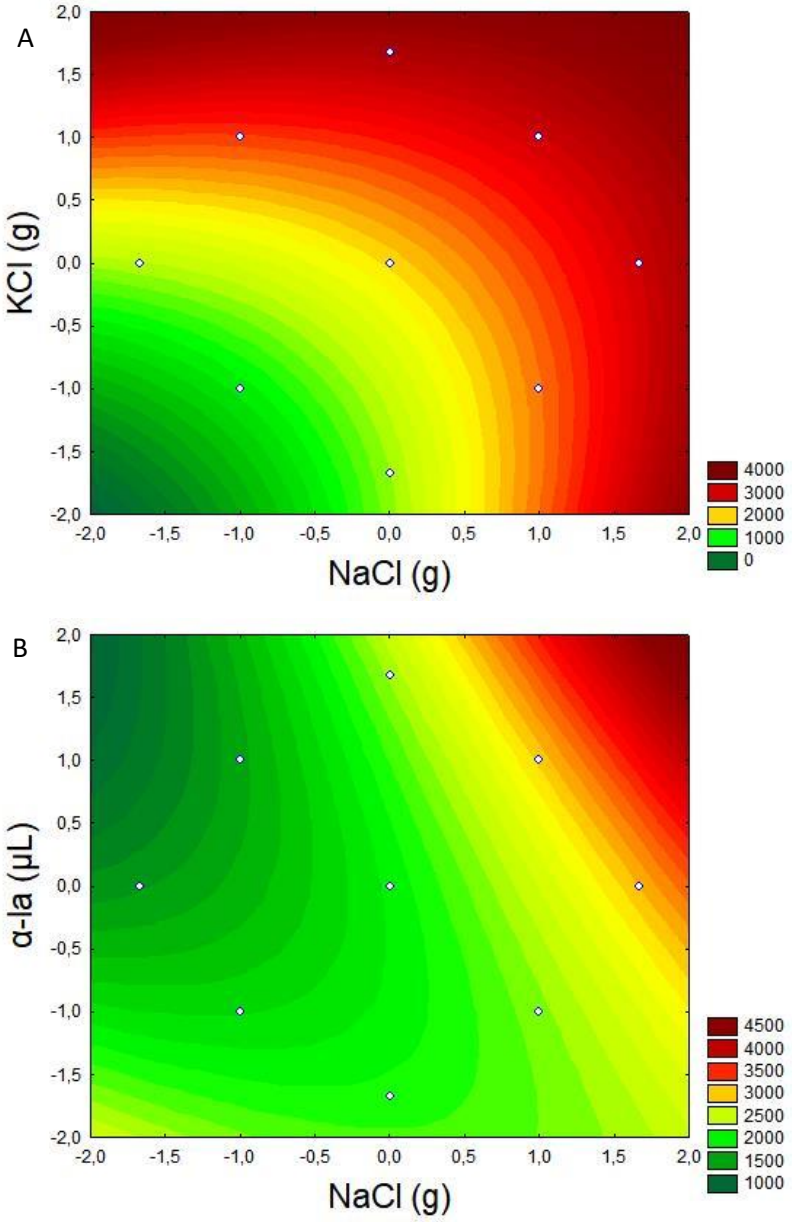
Tabela A4. ANOVA tendo como variável dependente a Condutividade sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

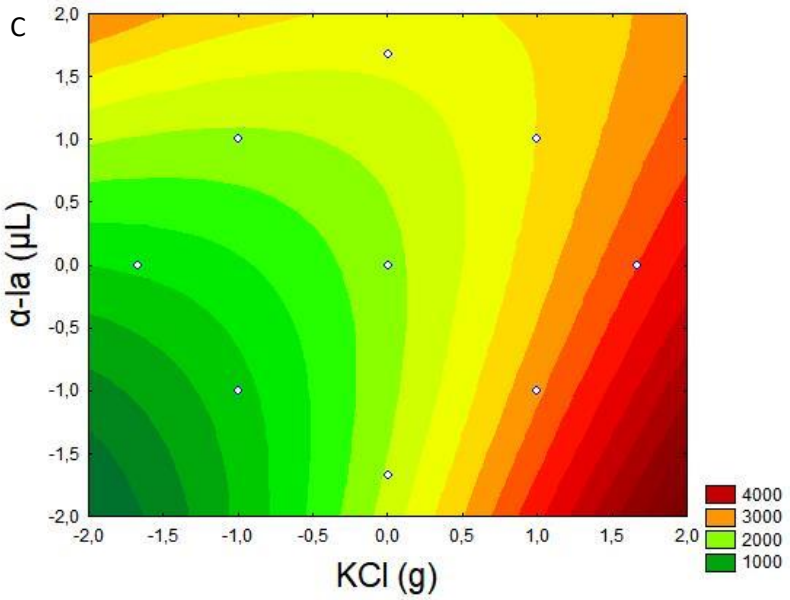
	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	3197736	1	3197736	14,07521	0,007152
NaCl (Q)	101525	1	101525	0,44688	0,525245
(2)KCl (L)	4638021	1	4638021	20,41480	0,002738
KCl (Q)	170853	1	170853	0,75203	0,414570
(3) alfa-la (L)	97658	1	97658	0,42985	0,533009
Alfa-la (Q)	89624	1	89624	0,39449	0,549883
1L by 2L	442806	1	442806	1,94906	0,205366
1L by 3L	488003	1	488003	2,14800	0,186180
2L by 3	742249	1	742249	3,26710	0,113628
Erro	1590324	7	227189		
Total SS	11431599	16			

Tabela A5. Valores comparando o F tabelado com o F calculado para o teste de ANOVA intervalo de confiança de 95 % para a variável a Condutividade.

	SS	DF	MS	F (calculado)	F (tabela)
Regressão	10207435	2	5103717,5	17,12	2,726
Resíduo	4172773	14	298055,21		
Total	14380208	16	898763		

Figura A5. Superfície de resposta 2D para a condutividade tendo como variáveis independentes A) as massas de NaCl e de KCl (g). B) massa de NaCl e o volume de α-la. C) massa de KCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo.





Apêndice B. Resultados de análises estatísticas da Análise de Perfil de Textura (TPA) dos queijos *minas frescal*.

Tabela B1. ANOVA tendo como variável dependente a Adesividade, sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com 95% de significância.

	SS	df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	139,498	1	139,498	0,61373	0,459068
NaCl (Q)	23,386	1	23,386	0,10289	0,757757
(2)KCl (L)	68,940	1	68,940	0,30330	0,598947
KCl (Q)	255,851	1	255,851	1,12562	0,323939
(3) alfa-la (L)	1363,609	1	1363,609	5,99925	0,044150
Alfa-la (Q)	1279,970	1	1279,970	5,63127	0,049386
1L by 2L	3,234	1	3,234	0,01423	0,908398
1L by 3L	125,295	1	125,295	0,55124	0,481977
2L by 3L	3078,127	1	3078,127	13,54233	0,007860
Erro	1591,077	7	227,297		
Total SS	7737,491	16			

Tabela B2. Valores comparando o F tabelado com o F calculado para o teste de ANOVA com intervalo de confiança de 95 %.para a variável adesividade.

	SS	DF	MS	F (calculado)	F (tabelado)
Regressão	290063,00	1	290063,00		

Resíduo	141784,5	15	9452,3	30,687	3,073
Total	431847,5	16	26990,47		

Figura B1. A) Superfície de resposta 2D tendo como variáveis independentes a massa de NaCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo. B) Superfície de resposta 2D tendo como variáveis independentes a massa de KCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo.

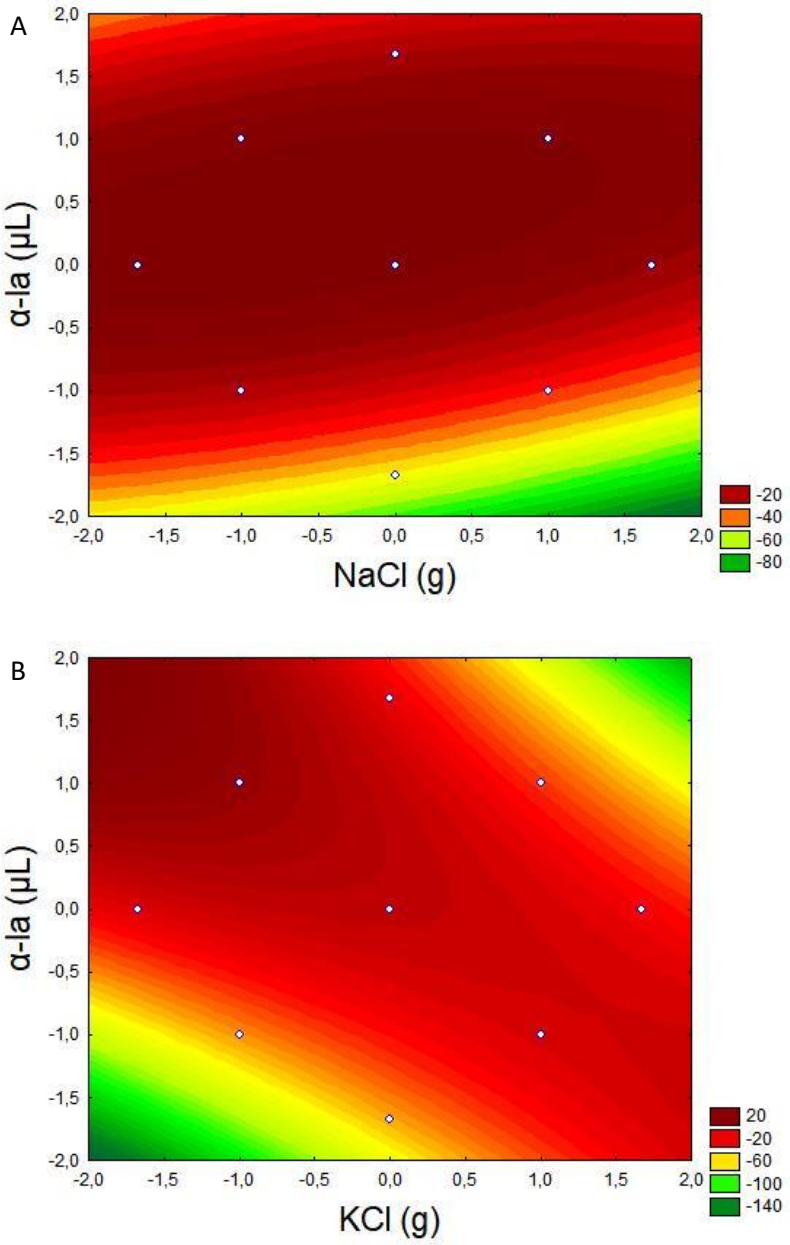


Tabela B3. ANOVA tendo como variável dependente a Elasticidade, sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com 95% de significância.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	0,000052	1	0,000052	0,025753	0,877038
NaCl (Q)	0,002147	1	0,002147	1,053344	0,338891
(2)KCl (L)	0,001042	1	0,001042	0,511119	0,497799
KCl (Q)	0,000158	1	0,000158	0,077417	0,788869
(3) alfa-la (L)	0,000206	1	0,000206	0,100905	0,760013
Alfa-la (Q)	0,000111	1	0,000111	0,054466	0,822144
1L by 2L	0,000751	1	0,000751	0,368316	0,563082
1L by 3L	0,000931	1	0,000931	0,456708	0,520860
2L by 3L	0,015762	1	0,015762	7,732472	0,027269
Erro	0,014269	7	0,002038		
Total SS	0,035169	16			

Tabela B4. Valores comparando o F tabelado com o F calculado para o teste de ANOVA com intervalo de confiança de 95 %.para a variável Elasticidade.

	SS	DF	MS	F (calculado)	F (tabela)
Regressão	0,026	2	0,013		
Resíduo	0,010399	14	0,0007	17,5017	2,736
Total	0,036798	16	0,0023		

Figura B2. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados com 17 corridas e 3 fatores. Com a elasticidade do queijo *minas frescal* como variável dependente.

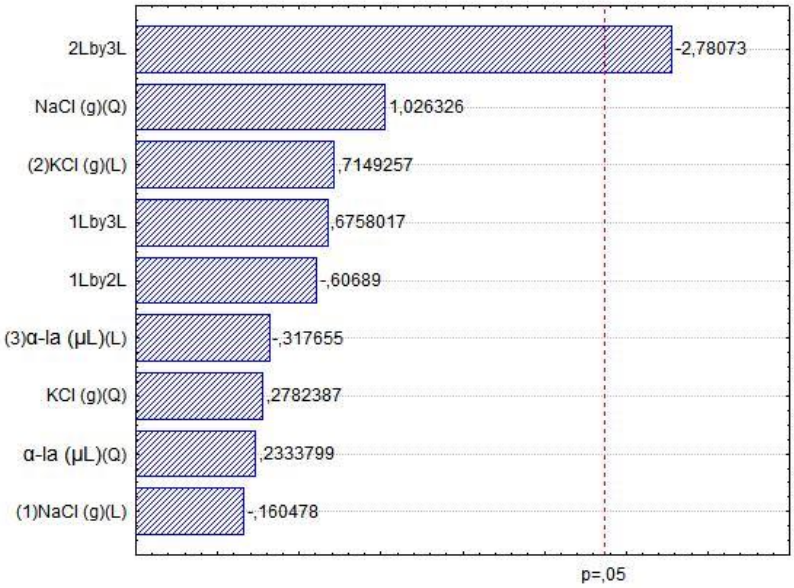


Figura B3. Superfície de resposta 2D tendo como variáveis independentes a massa de KCl e o volume de α-la adicionados no processo de produção de queijo.

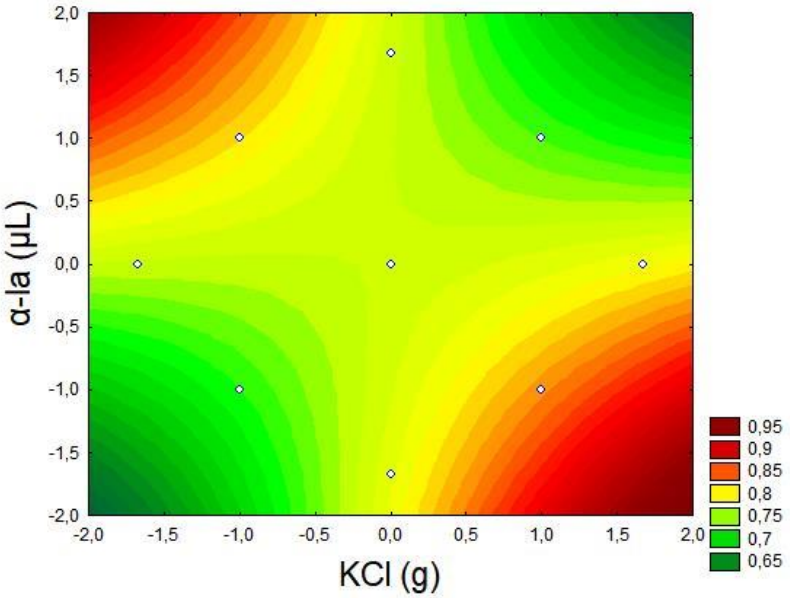


Tabela B5. ANOVA tendo como variável dependente a Dureza sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	305,17	1	305,170	0,390280	0,551963
NaCl (Q)	222,58	1	222,580	0,284656	0,610180
(2)KCl (L)	2554,72	1	2554,720	3,267214	0,113623
KCl (Q)	575,90	1	575,903	0,736519	0,419191
(3) alfa-la (L)	511,71	1	511,706	0,654418	0,445159
Alfa-la (Q)	294,23	1	294,227	0,376284	0,558995
1L by 2L	2480,42	1	2480,422	3,172196	0,118111
1L by 3L	599,52	1	599,522	0,766725	0,410270
2L by 3L	3365,50	1	3365,497	4,304113	0,076690
Erro	5473,48	7	781,926		
Total SS	16016,58	16			

Figura B4. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente a Dureza (N) com 17 corridas e 3 fatores.

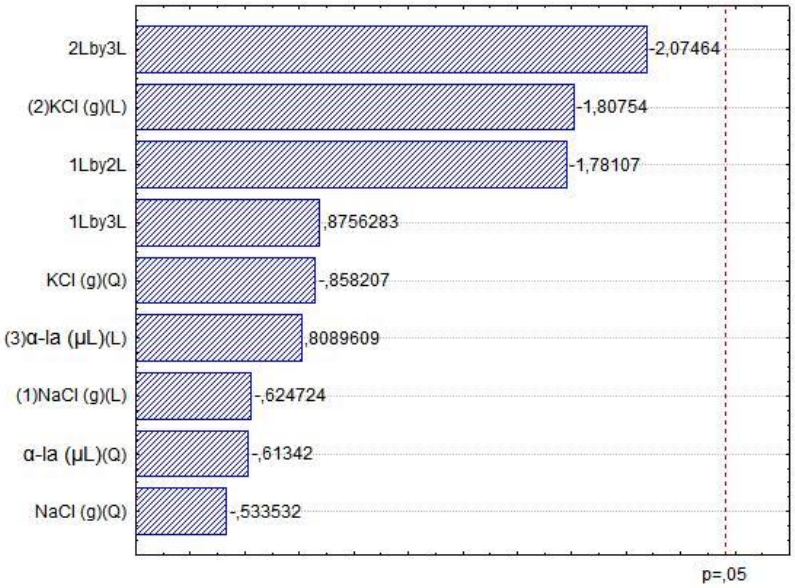


Tabela B6. ANOVA tendo como variável dependente a Mastigabilidade, sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	81,036	1	81,0358	0,385204	0,554493
NaCl (Q)	50,061	1	50,0614	0,237967	0,640585
(2)KCl (L)	864,855	1	864,8552	4,111094	0,082205
KCl (Q)	230,150	1	230,1500	1,094019	0,330350
(3) alfa-la (L)	10,728	1	10,7281	0,050996	0,827791
Alfa-la (Q)	73,051	1	73,0511	0,347249	0,574192
1L by 2L	559,484	1	559,4839	2,659510	0,146954
1L by 3L	38,888	1	38,8884	0,184856	0,680158
2L by 3L	891,966	1	891,9655	4,239963	0,078467
Erro	1472,597	7	210,3711		
Total SS	4171,923	16			

Figura B5. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente a Mastigabilidade com 17 corridas e 3 fatores.

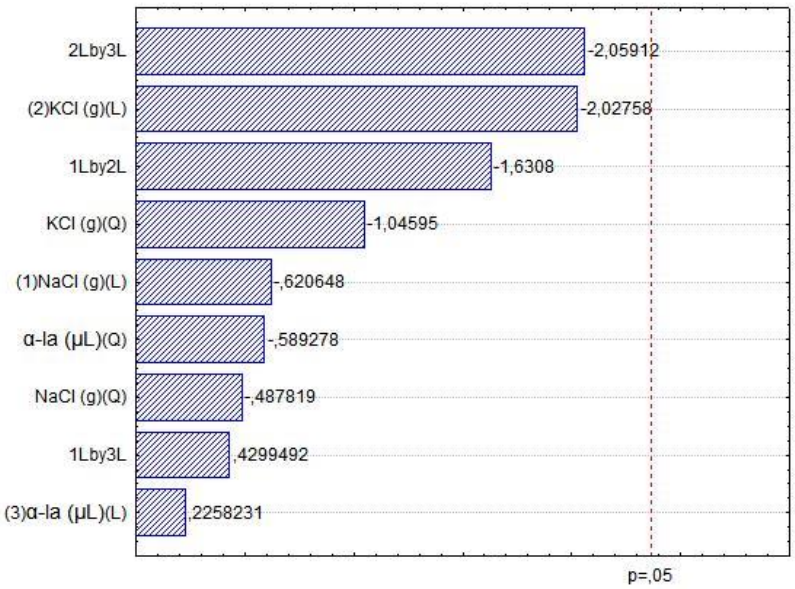


Tabela B7. ANOVA tendo como variável dependente a Coesividade, sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	0,000917	1	0,000917	0,069774	0,799274
NaCl (Q)	0,003358	1	0,003358	0,255537	0,628728
(2)KCl (L)	0,036132	1	0,036132	2,749258	0,141265
KCl (Q)	0,015114	1	0,015114	1,150035	0,319115
(3) alfa-la (L)	0,015974	1	0,015974	1,215441	0,306712
Alfa-la (Q)	0,003367	1	0,003367	0,256159	0,628318
1L by 2L	0,011754	1	0,011754	0,894337	0,375796
1L by 3L	0,024376	1	0,024376	1,854748	0,215435
2L by 3L	0,005420	1	0,005420	0,412432	0,541191
Erro	0,091997	7	0,013142		
Total SS	0,217331	16			

Figura B6. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente a Coesividade com 17 corridas e 3 fatores.

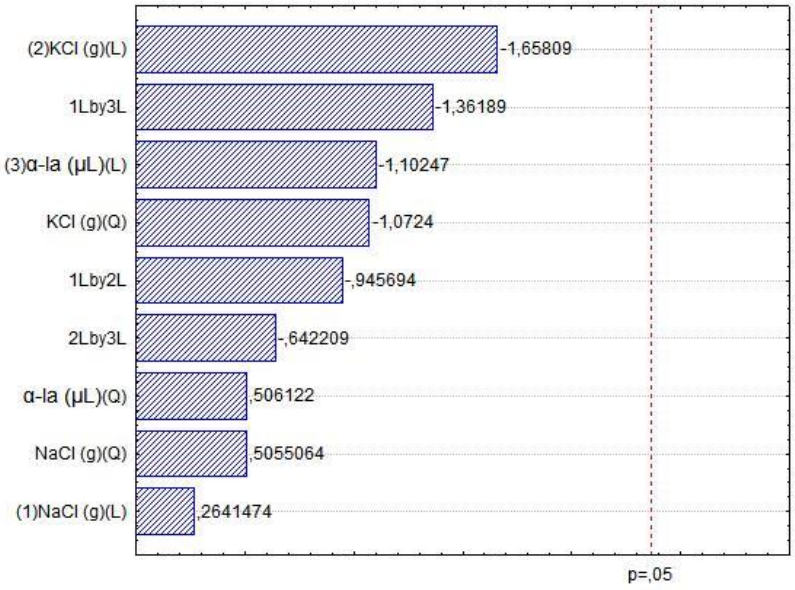


Tabela B8. ANOVA tendo como variável dependente a Resiliência, sendo 3 variáveis independentes e 17 corridas em 1 bloco com intervalo de confiança de 95 %.

	SS	Df	MS	F	p
(1)NaCl (L)	0,000000	1	0,000000	0,000073	0,993424
NaCl (Q)	0,002417	1	0,002417	0,448606	0,524468
(2)KCl (L)	0,014723	1	0,014723	2,732266	0,142319
KCl (Q)	0,005605	1	0,005605	1,040087	0,341748
(3) alfa-la (L)	0,003387	1	0,003387	0,628601	0,453898
Alfa-la (Q)	0,000461	1	0,000461	0,085617	0,778308
1L by 2L	0,004577	1	0,004577	0,849394	0,387385
1L by 3L	0,006471	1	0,006471	1,200918	0,309403
2L by 3L	0,003444	1	0,003444	0,639163	0,450287
Erro	0,037720	7	0,005389		
Total SS	0,082272	16			

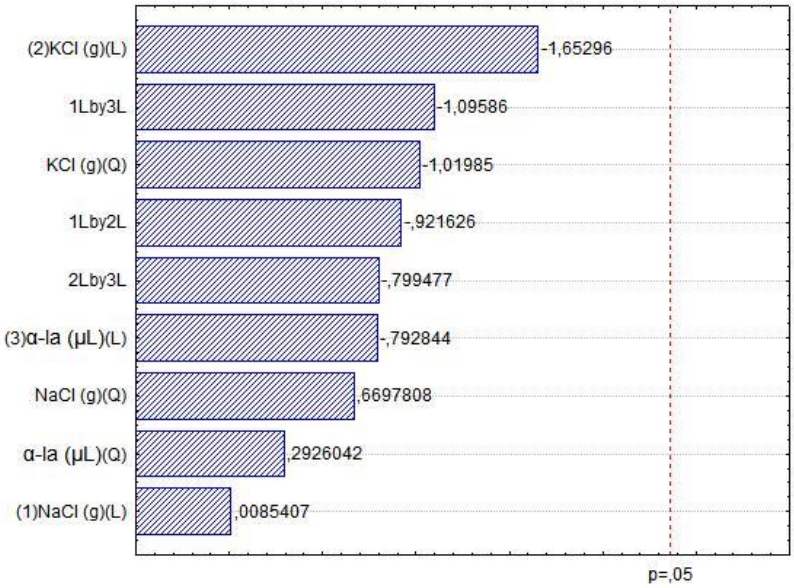



Figura B7. Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados tendo como variável dependente a Resiliência com 17 corridas e 3 fatores.