

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

**Nathalia da Silva Campos**

**Estudo da influência de diferentes estabilizantes na estrutura coloidal de leite  
desnatado**

**Juiz de Fora**

**2025**

**Nathalia da Silva Campos**

**Estudo da influência de diferentes estabilizantes na estrutura coloidal de leite  
desnatado**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Stephani

Coorientador: Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone

**Juiz de Fora**

**2025**

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

Campos, Nathalia da Silva.

Estudo da influência de diferentes estabilizantes na estrutura coloidal de leite desnatado / Nathalia da Silva Campos. -- 2025.

73 p.

Orientador: Rodrigo Stephani

Coorientador: Italo Tuler Perrone

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. Leite desnatado. 2. Sais sequestrantes de cálcio. 3. Sais estabilizantes. 4. Estabilidade térmica. 5. Substituição sódio-potássio. I. Stephani, Rodrigo, orient. II. Perrone, Italo Tuler, coorient. III. Título.

**Nathalia da Silva Campos**

**Estudo da influência de diferentes estabilizantes na estrutura coloidal de leite desnatado**

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

Aprovada em 24 de junho de 2025.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Rodrigo Stephani** - Orientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Ítalo Tuler Perrone** - Coorientador  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá**  
Instituto de Tecnologia de Alimentos

**Dra. Érica Felipe Maurício**  
Novonesis

**Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Mauricio Antônio Pereira da Silva**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 27/05/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Stephani, Professor(a)**, em 24/06/2025, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauricio Antonio Pereira da Silva, Professor(a)**, em 24/06/2025, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Antonio Sodre Costa, Professor(a)**, em 24/06/2025, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ERICA FELIPE MAURICIO, Usuário Externo**, em 24/06/2025, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá, Usuário Externo**, em 26/06/2025, às 07:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Italo Tuler Perroni, Professor(a)**, em 30/06/2025, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2420812** e o código CRC **2CD1C11E**.

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu pai  
(*in memoriam*) que sempre me apoiaram em  
todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) que nunca mediram esforços pela minha educação. Mãe, você sempre foi minha maior inspiração. Pai, obrigada pai pelos 16 anos em que vivemos juntos, você sempre foi o meu maior incentivador. Seu amor estará sempre vivo dentro de mim. Eu amo vocês infinitamente. Todos os meus passos e decisões são feitos pensando em vocês.

Gostaria de agradecer à minha tia Jaqueline e aos meus primos Laís e Gustavo que estão ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelos momentos compartilhados e por todo apoio. Eu amo vocês.

Ao meu namorado Alan, agradeço por todo companheirismo, amor e paciência. Obrigada por todos os anos juntos e por todo suporte e incentivo para alcançar todos os meus sonhos e objetivos. Sua disciplina e resiliência são uma inspiração para mim. Eu amo você.

A todos os amigos que me acompanham desde a graduação, em especial, Paulo Henrique e Thaís, que me acompanharam também nessa jornada do doutorado. Cada conversa, cada momento de estudo e reflexão, cada almoço em conjunto fizeram toda a diferença nessa caminhada. Estamos juntos há 10 anos e nada seria possível sem a amizade de vocês. Tenho um imenso carinho por vocês.

A todos os companheiros do Laboratório QUIMTEC. Sou muita grata pela ajuda de todos. Em especial, gostaria de agradecer aos amigos: Natalia Alves, Biany, Taynan, Ramon, Elisa, Marcos, Kamilla, João, Maria Eduarda, Heitor e Laryssa. A amizade construída entre nós foi essencial para tornar essa trajetória mais leve e mais feliz. Foi uma honra trabalhar na companhia de cada um de vocês.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Stephani por todo suporte desde a iniciação científica e por me dar a oportunidade de trabalhar neste projeto de doutorado. Agradeço também ao meu coorientador Dr. Ítalo Tuler Perrone por todo auxílio durante esse projeto. Agradeço também aos demais professores do NEEM/QUIMTEC por todo conhecimento compartilhado.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química. Agradeço também aos membros da banca, Prof. Dr. Maurício Antônio Pereira da Silva, Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa, Dr. Alisson Borges de Souza e Dra. Érica Felipe Maurício, por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas para o desenvolvimento do projeto.

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

## RESUMO

Esta tese de doutorado teve como objetivo principal investigar os efeitos da adição de diferentes sais quelantes de cálcio (sais estabilizantes) nas propriedades físico-químicas e na estrutura coloidal do leite desnatado. O trabalho foi estruturado em dois capítulos que abordaram aspectos fundamentais para a indústria de laticínios. No primeiro capítulo, avaliou-se a influência de sais sequestrantes de cálcio permitidos e não permitidos pela legislação brasileira para leite UHT. Foram testados citrato de sódio e diversos orto- e polifosfatos de sódio em cinco concentrações distintas (0,00; 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20% m.m<sup>-1</sup>). As amostras foram submetidas a tratamento térmico em banho de óleo a 155°C (F<sub>0</sub> = 1,43 minutos), seguidas de resfriamento rápido e análises físico-químicas. Os resultados demonstraram que o difosfato tetrassódico (TSP) e o trifosfato de sódio (STP) nas concentrações de 0,15% e 0,20% m.m<sup>-1</sup> promoveram as alterações mais significativas no sistema coloidal, com aumento acentuado do pH, elevada capacidade de sequestro de cálcio e diminuição do tempo de coagulação térmica. Além disso, esses sais alteraram significativamente a distribuição do tamanho de partículas e o equilíbrio do Ca<sup>2+</sup> em pH 4,0, mostrando que a concentração do sal influencia diretamente nas mudanças observadas. O segundo capítulo focou na comparação entre sais sequestrantes de cálcio formados por diferentes cátions (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>). Foram avaliados dois fosfatos de sódio (fosfato dissódico - DSP e fosfato trissódico - TSP) e seus análogos de potássio (fosfato dipotássico - DKP e fosfato tripotássico - TKP), além de citrato trissódico como controle. A substituição do íon sódio pelo potássio não alterou significativamente parâmetros como pH, capacidade de sequestro de cálcio ou tempo de coagulação térmica. Entretanto, observou-se que o fosfato tripotássico (TKP) em concentrações a partir de 0,10% m.m<sup>-1</sup> provocou alterações significativas no perfil de distribuição de partículas, sugerindo que o íon K<sup>+</sup> interage de forma distinta com as proteínas se comparado ao íon Na<sup>+</sup>. Em conclusão, essa tese traz uma contribuição sobre as interações entre sais sequestrantes de cálcio e a matriz láctea. Os resultados podem oferecer subsídios técnicos para a indústria otimizar processos e formulações, alinhando inovação tecnológica com exigências regulatórias e demandas de mercado.

**Palavras-chave:** Leite desnatado. Sais sequestrantes de cálcio. Sais estabilizantes. Estabilidade térmica. Substituição sódio-potássio. Propriedades coloidais.

## ABSTRACT

This doctoral thesis primarily aimed to investigate the effects of adding different calcium chelating salts (stabilizing salts) on the physicochemical properties and colloidal structure of skimmed milk. The work was structured in two chapters addressing fundamental aspects for the dairy industry. In the first chapter, we evaluated the influence of calcium sequestrant salts permitted and not permitted by Brazilian legislation for UHT milk. Sodium citrate and various sodium ortho- and polyphosphates were tested at five distinct concentrations (0.00, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20% w.w<sup>-1</sup>). Samples underwent heat treatment in an oil bath at 155°C ( $F_0 = 1.43$  minutes), followed by rapid cooling and physicochemical analyses. Results demonstrated that tetrasodium diphosphate (TSP) and sodium triphosphate (STP) at 0.15% and 0.20% w.w<sup>-1</sup> concentrations promoted the most significant changes in the colloidal system, with marked pH increase, high calcium sequestration capacity, and reduced heat coagulation time. Furthermore, these salts significantly altered particle size distribution and Ca<sup>2+</sup> equilibrium at pH 4.0, showing that salt concentration directly influences the observed changes. The second chapter focused on comparing calcium sequestrant salts formed by different cations (Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>). We evaluated two sodium phosphates (disodium phosphate - DSP and trisodium phosphate - TSP) and their potassium analogs (dipotassium phosphate - DKP and tripotassium phosphate - TKP), with trisodium citrate as control. Replacing sodium with potassium ions did not significantly alter parameters such as pH, calcium sequestration capacity or heat coagulation time. However, tripotassium phosphate (TKP) at concentrations from 0.10% w.w<sup>-1</sup> caused significant changes in particle size distribution profile, suggesting that K<sup>+</sup> ions interact differently with proteins compared to Na<sup>+</sup> ions. In conclusion, this thesis provides important contributions to understanding the interactions between calcium sequestrant salts and the milk matrix. The results may offer technical support for the industry to optimize processes and formulations, aligning technological innovation with regulatory requirements and market demands.

**Keywords:** Skimmed milk. Calcium sequestrant salts. Stabilizing salts. Thermal stability. Sodium-potassium replacement. Colloidal properties.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química dos sais quelantes de cálcio usados nesse estudo.....	28
Figura 2 - Exemplo de curva de tratamento térmico a qual as amostras foram submetidas. ...	28
Figura 3 - pH das amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m <sup>-1</sup> , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).....	33
Figura 4 - Capacidade sequestrante (%) das amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m <sup>-1</sup> , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).....	35
Figura 5 - Teor de Ca <sup>2+</sup> em pH = 4,0 (mM) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m <sup>-1</sup> , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).....	37
Figura 6 - Tempo de coagulação térmica (HCT, minutos) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m <sup>-1</sup> , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).....	40
Figura 7 - Dv90 (diâmetro hidrodinâmico no qual 90% das partículas estão distribuídas) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m <sup>-1</sup> , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F). ....	42
Figura 8 - Potencial ζ (mV) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m <sup>-1</sup> , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F). ....	44
Figura 9 - Estrutura química dos sais quelantes de cálcio usados no estudo. ....	49

Figura 10 - Delineamento experimental. ....51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição mineral do leite de vaca. ....	20
Tabela 2 - Concentrações (mM) de íons livres e associados na fase solúvel do leite. ....	22
Tabela 3 - Fórmula molecular, Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS), número <i>Chemical Abstracts Service</i> (CAS), teor de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> e solubilidade dos sais quelantes de cálcio usados nesse estudo. ....	27
Tabela 4 - Conversão da concentração adicionada dos sais de % (m.m <sup>-1</sup> ) para mM e teor de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%). ....	27
Tabela 5 - Nomenclaturas, fórmula molecular e INS ( <i>International Food Additive Numbering System</i> ) dos sais quelantes de cálcio usados no estudo. ....	50
Tabela 6 - Conversão das concentrações dos sais em % (m.m <sup>-1</sup> ) para mM. ....	50
Tabela 7 - pH das amostras sem e com tratamento térmico. ....	53
Tabela 8 - Capacidade sequestrante (%) das amostras sem e com tratamento térmico. ....	55
Tabela 9 - HCT (minutos) sem e com tratamento térmico. ....	57
Tabela 10 - Atividade do íon Ca <sup>2+</sup> em pH = 4,0 (mM) com tratamento térmico. ....	58
Tabela 11 - Diâmetro hidrodinâmico em que 90% das partículas são encontradas (Dv90) com tratamento térmico. ....	60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>14</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2.1.1	Objetivos específicos do primeiro capítulo .....	14
2.1.2	Objetivos específicos do segundo capítulo .....	14
<b>3</b>	<b>INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS ESTABILIZANTES NA ESTRUTURA COLOIDAL DE LEITE DESNATADO SOB CONDIÇÕES SIMULADAS DE TRATAMENTO TÉRMICO</b> .....	<b>16</b>
3.1	REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
3.1.1	Proteínas do leite .....	16
3.1.1.1	<i>Soroproteínas</i> .....	17
3.1.1.2	<i>Micelas de caseína</i> .....	18
3.1.2	Composição mineral do leite .....	19
3.1.3	Sais sequestrantes de cálcio (sais estabilizantes) .....	22
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>25</b>
4.1	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	25
4.2	ANÁLISES .....	29
4.2.1	Potencial hidrogeniônico (pH) .....	29
4.2.2	Capacidade sequestrante.....	29
4.2.3	Tempo de coagulação pelo calor (HCT).....	29
4.2.4	Cálcio iônico (Ca <sup>2+</sup> ) em pH = 4,0 .....	30
4.2.5	Distribuição do tamanho das partículas .....	30
4.2.6	Potencial zeta .....	30
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
5.1	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) .....	32
5.2	CAPACIDADE SEQUESTRANTE .....	34
5.3	CÁLCIO IÔNICO EM pH = 4,0.....	36
5.4	TEMPO DE COAGULAÇÃO PELO CALOR (HCT) .....	38
5.5	DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS .....	41

5.6	POTENCIAL ZETA .....	43
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS ESTABILIZANTES NA ESTRUTURA COLOIDAL DE LEITE DESNATADO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE SAIS DE SÓDIO E SAIS DE POTÁSSIO .....</b>	<b>46</b>
7.1	REFERENCIAL TEÓRICO .....	46
<b>8</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>48</b>
8.1	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	48
8.2	ANÁLISES .....	51
8.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	51
<b>9</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
9.1	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	52
9.2	CAPACIDADE SEQUESTRANTE.....	53
9.3	TEMPO DE COAGULAÇÃO PELO CALOR (HCT) .....	55
9.4	CÁLCIO IÔNICO EM pH = 4,0.....	57
9.5	DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS .....	58
<b>10</b>	<b>CONSIDERAÇÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O trabalho apresentado neste documento é um projeto de química e tecnologia na área de alimentos, vinculado ao Programa DAI (Doutorado Acadêmico para Inovação) da UFJF, em parceria com uma empresa multinacional fornecedora de produtos à base de minerais para o setor de alimentos. O objetivo geral é estudar a influência da adição de sais estabilizantes na estrutura coloidal de leite desnatado sob condições simuladas de tratamento térmico.

A tese está dividida em dois capítulos, sendo que no capítulo 1 é discutido a influência que os sais estabilizantes permitidos pela legislação brasileira para leite UHT exercem na estrutura coloidal de leite desnatado tratado termicamente, além de estudar a influência de mais dois estabilizantes que não são permitidos até o presente momento pela legislação brasileira. O capítulo 2 discute a influência de sais estabilizantes formados por diferentes cátions (sódio e potássio) e os impactos devido a troca do íon sódio pelo potássio na estrutura coloidal do leite desnatado tratado termicamente.

Apesar de existirem trabalhos na literatura científica sobre sais estabilizantes e seus efeitos nas características físico-químicas do leite, ainda há uma intensa discussão científica em relação aos mecanismos de ação desses sais e seus impactos no equilíbrio salino do leite e demais produtos lácteos como queijos, bebidas lácteas, bebidas proteicas, entre outros produtos. Além disso, existem diferentes modos de ação desses sais considerando os diferentes tipos de tratamentos térmicos que o leite e seus derivados podem sofrer (De Kort, 2012; De Kort *et al.*, 2012; Garcia; Alting; Huppertz, 2023; Pitkowski; Nicolai; Durand, 2008; Silva *et al.*, 2019; Tsioulpas *et al.*, 2010; Udabage; McKinnon; Augustin, 2000). Portanto, esse trabalho tem o objetivo de contribuir nos estudos sobre sais estabilizantes e sua influência nas características físico-químicas do leite, principalmente, quando submetido a processamentos térmicos.

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da tese foi estudar a influência de diferentes sais estabilizantes na estrutura coloidal de leite desnatado sob condições simuladas de tratamento térmico. No capítulo 1 foi avaliada a influência, de forma comparativa, dos sais estabilizantes permitidos pela legislação brasileira, além de mais dois sais não permitidos, na estrutura coloidal de leite desnatado antes e após o tratamento térmico. Já no capítulo 2, foi avaliada a influência de sais estabilizantes formados por diferentes cátions (sódio e potássio) e os impactos devido a troca do íon sódio pelo potássio na estrutura coloidal do leite desnatado antes e após o tratamento térmico.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos foram subdivididos para os dois capítulos da tese.

#### 2.1.1 Objetivos específicos do primeiro capítulo

- a) Estudar o efeito da adição de diferentes sais estabilizantes no pH do leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- b) Estudar a capacidade sequestrante dos diferentes sais estabilizantes adicionados em leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- c) Estudar o efeito da adição de diferentes sais estabilizantes no teor de  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 (cálcio total) do leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- d) Estudar o efeito da adição de diferentes sais estabilizantes na estabilidade térmica através do tempo de coagulação pelo calor (HCT) em leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- e) Estudar o efeito da adição dos diferentes sais estabilizantes na distribuição do tamanho das partículas através da análise de tamanho de partículas por difração a laser (LS) em leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- f) Estudar o efeito da adição dos diferentes sais estabilizantes na carga superficial das micelas de caseína através da análise de potencial zeta em leite desnatado antes e após o tratamento térmico.

#### 2.1.2 Objetivos específicos do segundo capítulo

- a) Comparar o efeito da adição de sais formados por diferentes cátions (sódio e potássio) no pH do leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- b) Comparar a capacidade sequestrante de sais formados por diferentes cátions (sódio e potássio) adicionados em leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- c) Estudar o efeito da adição de sais formados por diferentes cátions (sódio e potássio) na estabilidade térmica através do tempo de coagulação pelo calor (HCT) do leite desnatado antes e após o tratamento térmico;
- d) Estudar o efeito da adição de sais formados por diferentes cátions (sódio e potássio) no teor de  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 (cálcio total) do leite desnatado após o tratamento térmico;
- e) Estudar o efeito da adição dos sais formados por diferentes cátions (sódio e potássio) na distribuição do tamanho das partículas através da análise de tamanho de partículas por difração a laser (LS) em leite desnatado após o tratamento térmico.

### **3 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS ESTABILIZANTES NA ESTRUTURA COLOIDAL DE LEITE DESNATADO SOB CONDIÇÕES SIMULADAS DE TRATAMENTO TÉRMICO**

A partir da seção 3.1 será apresentada uma revisão bibliográfica baseado nos principais tópicos abordados nesse primeiro capítulo.

#### **3.1 REFERENCIAL TEÓRICO**

Os produtos lácteos, em geral, estão em crescente consumo e espera-se que essa tendência continue se expandindo devido ao crescimento populacional, aumento da urbanização e aumento da classe média. Além disso, há o desejo por um estilo de vida mais saudável e os produtos lácteos tendem a ser uma das principais escolhas para dietas (Anema, 2019). O leite é considerado importante na alimentação humana devido aos nutrientes presentes, como proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais (Walstra; Wouters; Geurts, 2006). Segundo o Anuário do Leite (2023), o leite inspecionado adquirido pelos laticínios no ano de 2022 alcançou a marca de 23,854 bilhões de litros, sendo que mais de 6 bilhões de litros foram destinados para a produção de leite UHT.

O leite é submetido a tratamentos térmicos por questões de saúde pública e conservação, com o intuito de eliminar possíveis patógenos, além de microrganismos deteriorantes e enzimas (Da Silva, 2003). O tratamento térmico do leite pode causar mudanças nos constituintes do leite, como possíveis reações de desnaturação proteica e formação de complexos entre proteínas do soro e caseínas, sendo que algumas dessas mudanças podem ser reversíveis enquanto outras são irreversíveis. Se o tratamento térmico for inferior a 95 °C durante alguns minutos, as modificações no equilíbrio salino do leite são consideradas reversíveis. Porém, aquecimentos severos, por exemplo, de 120 °C durante 20 minutos, causam mudanças irreversíveis nas micelas de caseína e no equilíbrio salino (Gaucheron, 2005; Holt, 1995; Nieuwenhuije; Huppertz, 2022). Portanto para compreender as mudanças causadas pelo tratamento térmico é preciso conhecer o conteúdo proteico e a composição mineral do leite.

##### **3.1.1 Proteínas do leite**

As proteínas representam componentes indispensáveis entre os três macronutrientes essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, desempenhando uma variedade de funções

biológicas críticas. No contexto do metabolismo humano, essas biomoléculas não apenas fornecem elementos estruturais para tecidos e células, mas também atuam como mediadoras em processos fisiológicos complexos, incluindo reações enzimáticas, transporte de substâncias e resposta imune. Além disso, as proteínas do leite interagem com diversos minerais, como cálcio, magnésio e ferro. Essas interações são fundamentais para uma ampla gama de funções corporais, como a mineralização óssea, a transmissão de impulsos nervosos e a regulação de processos enzimáticos. Dessa forma, reforça-se a importância das proteínas não apenas como fontes nutricionais, mas também como elementos-chave para a manutenção da saúde e para o funcionamento adequado dos sistemas biológicos (Gaucheron, 2011; Javed *et al.*, 2022).

As proteínas do leite constituem aproximadamente 3,5% de sua composição e são fundamentais tanto do ponto de vista nutricional quanto funcional. Elas se dividem em dois grupos principais: as caseínas e as proteínas do soro (soroproteínas). As caseínas representam cerca de 80% das proteínas totais do leite e se organizam em estruturas micelares, responsáveis pelo transporte de cálcio e fósforo, além de desempenharem papel essencial na formação de produtos lácteos, como queijos. Já as proteínas do soro, que correspondem aos 20% restantes, incluem a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoalbumina, entre outras, e são reconhecidas por seu alto valor biológico e pela presença de peptídeos bioativos, conferindo propriedades funcionais importantes para a saúde humana (Fox; McSweeney, 2013; Walstra; Wouters; Geurts, 2006).

### 3.1.1.1 Soroproteínas

No soro de leite, as proteínas majoritárias são a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) e a  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA), sendo a  $\beta$ -LG a mais abundante, seguida pela  $\alpha$ -LA. A  $\beta$ -lactoglobulina apresenta elevada capacidade de ligação a compostos hidrofóbicos, desempenhando funções relevantes no transporte de moléculas bioativas e na estabilidade nutricional do leite. A  $\alpha$ -lactoalbumina, por sua vez, é uma proteína fundamental na regulação da síntese de lactose na glândula mamária, além de apresentar propriedades nutricionais e biofuncionais significativas. Além dessas proteínas predominantes, o soro de leite contém outras proteínas em menores proporções, listadas em ordem decrescente de concentração: as imunoglobulinas, que conferem imunidade passiva ao neonato; a albumina do soro bovino (BSA), uma proteína de alto valor biológico envolvida no transporte de diversas moléculas; e a lactoferrina, uma glicoproteína multifuncional com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Ademais, encontram-se presentes proteínas de menor expressão quantitativa, como a lactoperoxidase — um componente enzimático do sistema de defesa antimicrobiano —, além

de fatores de crescimento e outras proteínas bioativas que colaboram para a ampla gama de funções biológicas atribuídas ao soro de leite (Smithers, 2008; Tavares, 2020).

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) é uma proteína globular de grande relevância no soro do leite, representando cerca de 50% das proteínas totais presentes nessa fração (Onwulata, 2009). A organização estrutural da  $\beta$ -LG é altamente dependente do pH do meio em que se encontra. Em condições fisiológicas, quando o pH é superior ao seu ponto isoelétrico (pH 5,4), a  $\beta$ -LG apresenta-se predominantemente na forma de dímeros, ou seja, duas unidades de proteína ligadas entre si (Peti *et al.*, 2011).

Quando o pH é inferior a 3,5 ou superior a 7,5, ocorre a dissociação desses dímeros em monômeros, fazendo com que a  $\beta$ -LG exista como moléculas individuais. Em um intervalo de pH entre 3,5 e 5,2, a proteína tende a formar agregados maiores, com múltiplas unidades associadas (Poppi *et al.*, 2015). Em temperatura ambiente, a  $\beta$ -LG pode coexistir tanto na forma de dímeros quanto de monômeros, dependendo do pH do meio. Entretanto, quando a temperatura ultrapassa 40 °C e o pH está entre 6 e 9, há uma tendência à dissociação dos dímeros em monômeros (Sousa, 2019).

Em temperaturas superiores a 70 °C, a  $\beta$ -LG sofre alterações estruturais mais acentuadas, perdendo suas configurações secundária e terciária. Essa desnaturação expõe grupos sulfidril (-SH) que, anteriormente, estavam protegidos no interior da proteína, permitindo a formação de ligações covalentes entre diferentes moléculas e promovendo a agregação proteica (Onwulata, 2009; Peti *et al.*, 2011; Poppi *et al.*, 2015).

### 3.1.1.2 Micelas de caseína

As caseínas representam cerca de 80% do conteúdo proteico do leite e se apresentam na forma de micelas de caseína. Elas são constituídas por moléculas de caseína ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas), água e minerais e desempenham funções biológicas como vetores de cálcio, que passam das fêmeas de mamíferos para os neonatos, além de ser fonte de aminoácidos (Holt, 2016; Walstra; Wouters; Geurts, 2006).

As caseínas são descritas como agregados supramoleculares que são mantidas por interações intermoleculares, possuem diâmetro médio de 200 nm e são consideradas estruturas dinâmicas, pois se transformam de acordo com as condições físico-químicas do meio como pH, temperatura, força iônica, presença de enzimas, entre outros. Por esse motivo sua estabilidade ou desestabilização controlada é de extrema importância para o desenvolvimento de derivados lácteos (Silva *et al.*, 2019).

Dentre os minerais que fazem parte das caseínas está o fósforo. Portanto, todas as caseínas são fosforiladas. Os grupos fosfatos se ligam preferencialmente aos aminoácidos serina e, menos frequentemente, aos aminoácidos treonina, como demonstrado nos estudos de Holland & Boland (2014) e Huppertz (2013). Esses grupos fosfatos carregados negativamente possuem afinidade por minerais positivamente carregados, especialmente cátions bivalentes. Por isso, as caseínas têm uma capacidade de se ligar a minerais como o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e o magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), formando complexos estáveis (Silva *et al.*, 2019).

A  $\alpha_{\text{S1}}$ -caseína, que representa cerca de 40% do total de caseínas. Do ponto de vista funcional, as  $\alpha_{\text{S1}}$ -caseínas demonstram sensibilidade moderada à precipitação por cálcio, ocorrendo na presença de 3-8 mM de  $\text{CaCl}_2$  em pH 7,0 (Huppertz, 2013; Aoki *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2019).

A  $\alpha_{\text{S2}}$ -caseína, correspondendo a aproximadamente 10% do total de caseínas, destaca-se por apresentar o maior grau de fosforilação entre as caseínas. Esta fração proteica é considerada a mais hidrofílica entre as caseínas. Sua extrema sensibilidade ao cálcio é evidenciada pela precipitação de 90% da proteína na presença de apenas 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  em pH 7,0, comportamento atribuído ao seu elevado conteúdo de grupos fosfato (Aoki *et al.*, 1985; Swaisgood, 2003; Silva *et al.*, 2019).

A  $\beta$ -caseína (35% do total de caseínas) apresenta um comportamento termossensível em relação à precipitação por cálcio. Enquanto são necessários 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  para induzir sua precipitação a 20°C, apenas 4 mM são suficientes para obter o mesmo efeito a 40°C (Dalglish; Parker, 1980; Huppertz, 2013).

Por fim, a  $\kappa$ -caseína, que representa aproximadamente 15% das caseínas totais, diferencia-se das demais por sua natureza glicosilada. Ao contrário das outras caseínas, a  $\kappa$ -caseína apresenta baixa sensibilidade ao cálcio, comportamento atribuído ao seu reduzido grau de fosforilação (Swaisgood, 2003). De acordo com imagens feitas através das técnicas de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura, a  $\kappa$ -caseína está localizada na superfície das micelas de caseína, sendo a camada responsável pela carga negativa das micelas de caseína e desempenhando papel crucial na estabilização das micelas de caseína no leite (Ouanezar *et al.*, 2012; Dalglish *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2019).

### 3.1.2 Composição mineral do leite

A composição mineral do leite é complexa e se relaciona diretamente com as caseínas, pois os minerais são parte de sua estrutura. Além disso, a composição mineral depende de

fatores genéticos, estágios de lactação, alimentação e saúde dos animais. A fração mineral do leite contém cátions como cálcio, magnésio, sódio e potássio, além de ânions como fosfato inorgânico, citrato e cloreto. O citrato, apesar de ser uma molécula orgânica, tem considerável participação no equilíbrio entre os minerais (Gaucheron, 2005). A Tabela 1 apresenta as faixas de concentração desses minerais no leite de vaca.

Tabela 1 - Composição mineral do leite de vaca.

<b>Mineral</b>	<b>Concentração (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (mmol.kg<sup>-1</sup>)</b>
Cálcio	1043-1283	26-32
Magnésio	97-146	4-6
Fosfato inorgânico	1805-2185	19-23
Fósforo total	930-992	30-32
Citrato	1323-2079	7-11
Sódio	391-644	17-28
Potássio	1212-1681	31-43
Cloreto	772-1207	22-34

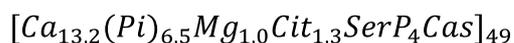
Fonte: Adaptado de (Gaucheron, 2005).

Os sais se distribuem no leite em duas fases: a fase livre ou solúvel e a fase ligada às micelas de caseína ou coloidal (Bauland; Gaucheron; Croguennec, 2022; Gaucheron, 2005; Nieuwenhuije; Huppertz, 2022; Ordoñez *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2019). Os íons potássio, sódio e cloreto estão essencialmente na fase solúvel. Mas os íons cálcio, fosfato inorgânico e magnésio estão parcialmente ligados às micelas de caseína. Cerca de um terço do cálcio, metade do fosfato inorgânico, dois terços do magnésio e mais de 90% do citrato estão na fase solúvel do leite. Dessa forma, cálcio, fosfato inorgânico e magnésio se encontram tanto na fase solúvel quanto na fase coloidal (Gaucheron, 2005).

Na fase solúvel do leite, os íons não se apresentam totalmente isolados em solução, ocorrendo diferentes associações entre eles. Essas associações dependem da capacidade de ligação entre cátions e ânions e das solubilidades dos sais formados (Bauland; Gaucheron; Croguennec, 2022; Gaucheron, 2005; Holt; Dalgleish; Jenness, 1981). Holt, Dalgleish e Jenness (1981) propuseram um cálculo para o equilíbrio de íons presentes na fase solúvel do leite. Na Tabela 2 é apresentado um exemplo deste cálculo explicitando as diferentes associações.

De acordo com a Tabela 2, o cálcio existe como íon livre e forma um complexo estável principalmente com citrato, e em menor grau com fosfato inorgânico e com cloreto. A baixa quantidade de fosfato de cálcio na fase solúvel se deve às baixas solubilidades destes sais. O sódio e o potássio existem principalmente como íons livres, mas uma pequena parte desses íons está associada ao citrato, fosfato inorgânico e cloreto (Gaucheron, 2005).

A fase coloidal contém dois principais tipos de sais: cátions e ânions ligados diretamente aos resíduos de aminoácidos das caseínas e o fosfato de cálcio coloidal. Em relação aos cátions e ânions ligados aos aminoácidos, as caseínas contêm grupos fosfato ligados principalmente aos resíduos seril (fosfoseril). Como consequência disso, as caseínas apresentam afinidade por cátions bivalentes como cálcio e magnésio. No entanto, em relação ao fosfato de cálcio coloidal, ainda não existe um consenso sobre sua estrutura química (Silva *et al.*, 2019). De acordo com Kruif e Holt (2003), a fórmula química do fosfato de cálcio coloidal é dada por:



em que Pi é fosfato inorgânico, SerP<sub>4</sub>Cas é um peptídeo fosforilado e Cit é citrato.

Na literatura é descrito que o fosfato de cálcio, presente na fase solúvel do leite, tem sua solubilidade diminuída durante o tratamento térmico. Além disso, são descritas mudanças na estrutura e composição do fosfato de cálcio coloidal para uma forma mais insolúvel (Holt, 1995). As novas estruturas formadas não são claramente identificadas, embora alguns autores relacionem a formação de β-fosfato tricálcico cristalino ou hidroxiapatita (Nelson; Holt; Huckins, 1989; Visser *et al.*, 1986).

Os minerais das fases solúvel e coloidal estão em equilíbrio dinâmico, pois os íons e os sais estão em constante troca entre as fases, principalmente cálcio e fosfato inorgânico. A cinética de troca é dependente das condições físico-químicas como pH, temperatura, força iônica, entre outros. Portanto, qualquer tipo de modificação na concentração das espécies iônicas na fase solúvel, por meio de acidificação, concentração, aquecimento, adição de sais, entre outros fatores, acarreta mudanças no equilíbrio salino. A adição de sais estabilizantes (quelantes de cálcio) com o intuito de aumentar a estabilidade térmica do leite é um dos fatores que afeta tal equilíbrio (Bauland; Gaucheron; Croguennec, 2022).

Tabela 2 - Concentrações (mM) de íons livres e associados na fase solúvel do leite.

Ânion	Íon livre	Íon complexado			
		Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
HCit <sup>-</sup>	0,04	0,01	+	+	+
Cit <sup>3-</sup>	0,26	6,96	2,02	0,03	0,04
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7,50	0,07	0,04	0,10	0,18
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2,65	0,59	0,34	0,39	0,52
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	+	0,01	+	+	+
Glc-1-PH <sup>-</sup>	0,50	+	+	0,01	0,01
Glc-1-P <sup>2-</sup>	1,59	0,17	0,07	0,10	0,14
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,11	-	-	-	-
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,32	0,01	+	+	+
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+	+	+	+	+
Cl <sup>-</sup>	30,90	0,26	0,07	0,39	0,68
HSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	+	+	+	+	+
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,96	0,07	0,03	0,04	0,10
RCOOH	0,02	-	-	-	-
RCOO <sup>-</sup>	2,98	0,03	0,02	0,02	0,04
Íon livre	-	2,00	0,81	20,92	36,29

Concentração mostrada como: (+) <0,005 e (-) não estimada.

Fonte: Adaptado de (Holt; Dalgleish; Jenness, 1981).

### 3.1.3 Sais sequestrantes de cálcio (sais estabilizantes)

A estabilidade térmica do leite é o tempo necessário para originar coagulação visível a uma determinada temperatura e determinado pH e dentre os fatores que a influenciam estão: tempo e temperatura, pH, equilíbrio salino, teor natural de ureia, estabilidade das micelas de caseína, período de lactação, alimentação deficiente do gado e mastite. Portanto, a estabilidade térmica corresponde à capacidade do leite em resistir à coagulação pelo calor visando sua aptidão para o processamento (Da Silva, 2003; Da Silva; Almeida, 1998).

Os sais estabilizantes, que também são chamados de sais sequestrantes de cálcio ou sais quelantes de cálcio, são aditivos usados para aumentar a estabilidade térmica do leite ou retardar

a gelificação em produtos lácteos. Esses sais são formados por cátions monovalentes, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , e ânions polivalentes, como fosfatos e citratos (Deshwal *et al.*, 2023). Dessa forma, eles agem diminuindo a atividade química de cátions metálicos, como o  $\text{Ca}^{2+}$ , ao formar complexos com esses íons através de seus pares de elétrons não compartilhados (McIntyre; O'Sullivan; O'Riordan, 2016).

Na literatura científica, encontra-se o uso de diferentes sais estabilizantes em produtos lácteos, como: citratos (citrato trissódico e citrato tripotássico), ortofosfatos (monofosfato monossódico, monofosfato dissódico, monofosfato trissódico e seus equivalentes com o íon potássio) e fosfatos poliméricos ou fosfatos condensados (difosfato de sódio, difosfato tetrassódico, tripolifosfato de sódio, hexametáfosfato de sódio, entre outros) (Udabage; McKinnon; Augustin, 2000; De Kort *et al.*, 2011; De Kort *et al.*, 2012; McIntyre; O'Sullivan; O'Riordan, 2016; Garcia; Alting; Huppertz, 2023a; Garcia; Alting; Huppertz, 2023b; Tsioulpas *et al.*, 2010; Deshwal *et al.*, 2023; Deshwal *et al.*, 2024; Mejares; Chandrapala; Huppertz, 2023; Mejares; Huppertz; Chandrapala, 2024).

A adição desses compostos afeta a estabilidade térmica do leite, pois diminuem a concentração de íons livres de cálcio na fase solúvel que reduz a agregação das proteínas induzidas pelo cálcio e, conseqüentemente, aumenta a estabilidade térmica e vida útil do leite. Esse tipo de aditivo também resolve problemas tecnológicos no processamento de leite, pois evitam a formação de depósitos em trocadores de calor (De Kort, 2012; De Kort *et al.*, 2012; Garcia; Alting; Huppertz, 2023; Gaucheron, 2005; Pitkowski; Nicolai; Durand, 2008; Tsioulpas *et al.*, 2010; Udabage; McKinnon; Augustin, 2000).

No entanto, os quelantes agem de maneiras diferentes e podem diminuir a estabilidade térmica do leite em uma determinada concentração, pois podem quelar o fosfato de cálcio coloidal fazendo com que a integridade da estrutura micelar seja perdida. Além disso, os estabilizantes podem dissociar a caseína e alterar a distribuição do tamanho das partículas do leite (De Kort, 2012; Garcia; Alting; Huppertz, 2023; Pitkowski; Nicolai; Durand, 2008; Renhe; Indris; Corredig, 2018).

Recentemente, Deshwal *et al.* (2024) demonstraram que, com exceção do difosfato de sódio (SDP) e do tetrassódio difosfato (TSDP), a adição de monofosfato dissódico (DSMP), tripolifosfato de sódio (STP), hexametáfosfato de sódio (SHMP) e citrato de sódio (TSC) a uma solução de 5% de isolado de caseína micelar reduziu o tamanho das partículas e a viscosidade à medida que a concentração de sais quelantes aumentava. Mejares, Chandrapala e Huppertz (2023) investigaram a viabilidade da adição de TSC e DSMP a misturas de leite de vaca desnatado e leite de búfala desnatado em uma concentração de 5mM, utilizando diferentes

tratamentos térmicos (85 e 95°C por 5 minutos), e concluíram que a adição de sais quelantes alterou o tamanho das partículas, o potencial zeta, o pH, a atividade dos íons de cálcio e a distribuição das proteínas de maneira dependente da composição.

De acordo com a Portaria nº 783 de 2025 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é permitido o uso de alguns sais estabilizantes em leite UHT. Dentre eles, estão: citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio e trifosfato de sódio, podendo ser adicionados de forma separada ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0,1 g.100 mL<sup>-1</sup> expressos em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Brasil, 2025).

Nesse sentido, torna-se importante estudar os sais sequestrantes de cálcio permitidos pela legislação brasileira para leite UHT e sua influência nas características físico-químicas do produto, especialmente considerando o limite para P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Brasil, 2025) exigido por ela. Esse tipo de estudo pode auxiliar na escolha do sal estabilizante que melhor atenda às demandas da indústria de laticínios, bem como na redução da quantidade desse aditivo utilizada pela indústria. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a influência da adição de diferentes sais estabilizantes na estrutura coloidal do leite desnatado sob condições simuladas de tratamento térmico.

## 4 METODOLOGIA

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

### 4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo das amostras seguiu a metodologia descrita por Campos *et al.* (2024). As amostras foram preparadas a partir de leite em pó desnatado de baixo tratamento térmico (Land O'Lakes, Inc.) com a seguinte composição físico-química: gordura 0,74%, umidade 3,28%, proteína 38,63% e índice de nitrogênio de proteína do soro (WPNI) 7,80 mgN·g<sup>-1</sup>. O leite em pó foi utilizado para garantir que o experimento pudesse ser realizado com réplicas (duplicatas) e para observar sua reprodutibilidade. O leite em pó foi reconstituído com água deionizada à temperatura ambiente (22 ± 2 °C) para 9% m·m<sup>-1</sup> de sólidos totais. O leite reconstituído foi deixado na geladeira (8 °C) por 24 horas para assegurar a completa solubilização (hidratação proteica) do pó. Após esse período, foram realizadas análises físico-químicas utilizando o analisador portátil de leite ultrassônico Ekomilk (Cap-Lab, São Paulo, Brasil), obtendo-se a seguinte composição: gordura 0,28 ± 0,07%, matéria seca desengordurada 9,11 ± 0,58%, densidade 1,035 ± 0,002 g·mL<sup>-1</sup>, proteína 3,55 ± 0,22% e lactose 4,88 ± 0,31%.

As amostras foram preparadas a partir do leite reconstituído, com a adição dos seguintes sais: citrato de trissódico (TSC), monofosfato de sódio (SMP), difosfato de sódio (SDP), tripolifosfato de sódio (STP), monofosfato dissódico (DSMP) e difosfato tetrassódico (TSDP). Todos os sais foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos sais citados acima. A Tabela 3 apresenta o Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS) e os números do *Chemical Abstracts Service* (CAS) para cada sal, bem como a fórmula molecular, coeficiente de solubilidade e teor de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Maurer-Rothmann; Scheurer, 2005). As concentrações utilizadas para cada sal foram 0,00 (controle), 0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% (m·m<sup>-1</sup>). E por fim a Tabela 4 apresenta a conversão da concentração de cada sal de % (m·m<sup>-1</sup>) para mM e o teor de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

As amostras foram submetidas a tratamento térmico em banho de óleo a 155 °C por 8 minutos (F<sub>0</sub> = 1,43 min). Em seguida, foram resfriadas em banho de gelo até atingirem temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Um exemplo de curva de tratamento térmico a qual as amostras foram submetidas é apresentado na Figura 2. Após esse processo, as amostras foram

analisadas usando o conjunto de análises descritas na seção 4.2, antes e depois de serem submetidas ao tratamento térmico. A preparação e análise das amostras foram realizadas em duplicata.

O valor de  $F_0$  e a curva de tratamento térmico (Figura 2) foram determinados utilizando uma calculadora para determinar a letalidade e as alterações químicas em produtos UHT com a regra de Simpson disponível em Mullan (2018).

Tabela 3 - Fórmula molecular, Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares (INS), número *Chemical Abstracts Service* (CAS), teor de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e solubilidade dos sais quelantes de cálcio usados nesse estudo.

Sais*	Fórmula molecular	INS	CAS	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	Solubilidade
					(g·100 g <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O) 20 °C/80 °C
TSC	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	331iii	6132-04-3	-	75,0/99,8
SMP	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	339i	7558-80-7	59,2	85,2/207,3
SDP	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	450i	7758-16-9	63,9	13,0/20,0
STP	Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	451i	7758-29-4	57,9	14,6/-
DSMP	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	339ii	7558-79-4	50,0	9,3/96,6
TSDP	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	450iii	7722-88-5	53,4	6,2/30,0

\*citrato trissódico (TSC), monofosfato de sódio (SMP), difosfato de sódio (SDP), trifosfato de sódio (STP), monofosfato dissódico (DSMP), e difosfato tetrassódico (TSDP).

Fonte: Campos *et al.* (2024).

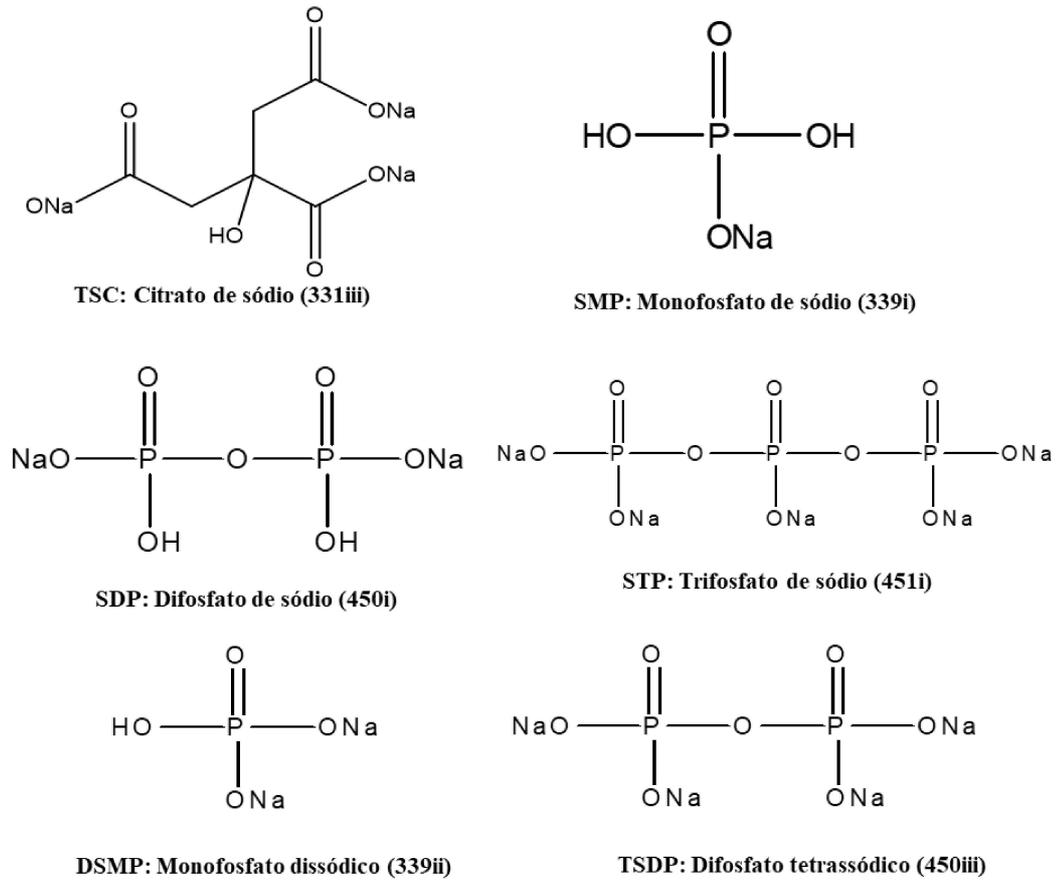
Tabela 4 - Conversão da concentração adicionada dos sais de % (m.m<sup>-1</sup>) para mM e teor de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%).

Sais*	mM				P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)			
	0,05%	0,10%	0,15%	0,20%	0,05%	0,10%	0,15%	0,20%
TSC	1,70	3,40	5,10	6,80	-	-	-	-
SMP	4,17	8,33	12,50	16,67	0,03	0,06	0,09	0,12
SDP	2,25	4,51	6,76	9,01	0,03	0,06	0,10	0,13
STP	1,36	2,72	4,08	5,44	0,03	0,06	0,09	0,12
DSMP	3,52	7,04	10,57	14,09	0,03	0,05	0,08	0,10
TSDP	1,88	3,76	5,64	7,52	0,03	0,05	0,08	0,11

\*citrato trissódico (TSC), monofosfato de sódio (SMP), difosfato de sódio (SDP), trifosfato de sódio (STP), monofosfato dissódico (DSMP), e difosfato tetrassódico (TSDP).

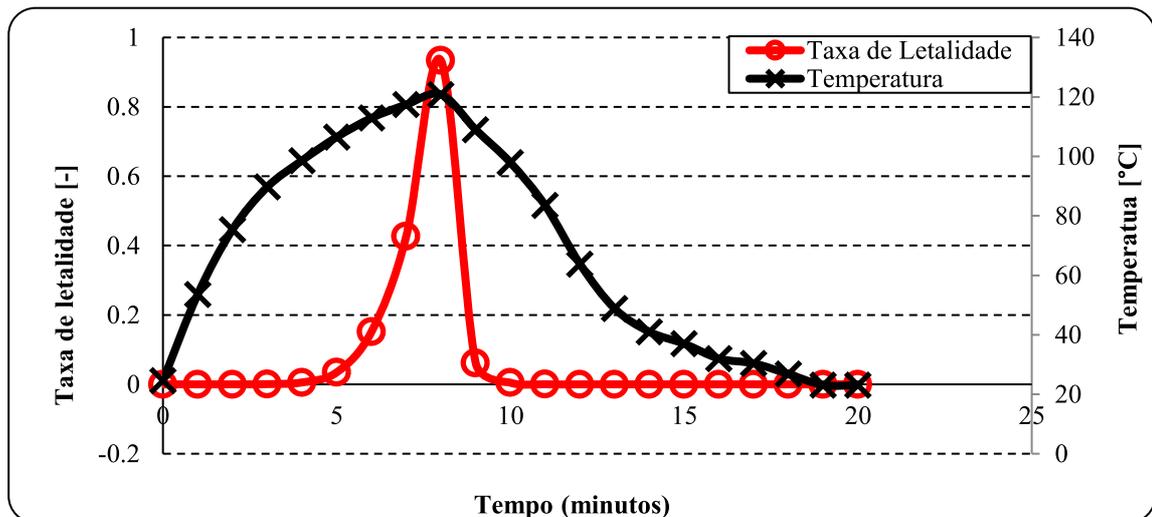
Fonte: Campos *et al.* (2024).

Figura 1 - Estrutura química dos sais quelantes de cálcio usados nesse estudo.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 2 - Exemplo de curva de tratamento térmico a qual as amostras foram submetidas.



Fonte: Campos *et al.* (2024).

## 4.2 ANÁLISES

A seguir estão descritas as análises que foram realizadas nas amostras adicionadas de sais estabilizantes antes e após o tratamento térmico.

### 4.2.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi medido a temperatura ambiente usando o medidor de pH PG1400 (Gehaka, São Paulo, Brasil). O equipamento foi calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

### 4.2.2 Capacidade sequestrante

A capacidade sequestrante foi medida indiretamente através da determinação da atividade do  $\text{Ca}^{2+}$ , conforme descrito por Campos *et al.* (2024). A atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  foi feita através da adição direta de uma pequena alíquota da amostra no sensor do eletrodo íon seletivo portátil para  $\text{Ca}^{2+}$  LAQUAtwin (Horiba Instruments, Kyoto, Japão). O eletrodo foi calibrado usando soluções padrão de cálcio de 3,74 mM (150 ppm) e 49,90 mM (2000 ppm) antes de cada experimento. As soluções padrão de 150 e 2000 ppm foram adquiridas pelo fornecedor do equipamento e continham 0,04% e 0,55% (m.m<sup>-1</sup>) de cloreto de cálcio, respectivamente, e 0,75% (m.m<sup>-1</sup>) de cloreto de potássio em ambas as soluções.

Todas as medidas de capacidade sequestrante foram feitas sem ajuste de pH. O equipamento descrito acima faz o registro dos resultados em ppm, portanto foi necessária a conversão desses resultados para a forma de capacidade sequestrante (CS). Para isso, a Equação 1 foi aplicada, em que  $C_{\text{amostra}}$  é a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (em ppm) da amostra a ser convertida e  $C_{\text{controle}}$  é a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (em ppm) presente na amostra controle (sem adição dos sais).

$$CS (\%) = 100\% - \left( \frac{C_{\text{amostra}} (\text{ppm}) \times 100}{C_{\text{controle}} (\text{ppm})} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

### 4.2.3 Tempo de coagulação pelo calor (HCT)

A determinação do tempo de coagulação térmica (HCT) das amostras foi feito através de uma adaptação do procedimento descrito por Dumpler e Kulozik (2015). Para o ensaio, utilizou-se um frasco de vidro com 10 mL de amostra, que foi colocado em um agitador e imerso

em um banho de óleo a 155 °C. O frasco foi posicionado de modo que o nível da amostra coincidissem com o nível do óleo, facilitando a observação do início da coagulação. O HCT corresponde ao intervalo de tempo entre a inserção da amostra no banho de óleo e o surgimento dos primeiros sinais visíveis de coagulação. O tempo foi registrado em minutos.

#### **4.2.4 Cálcio iônico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) em pH = 4,0**

A determinação da atividade do  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 também foi feita conforme descrição de Campos *et al.* (2024). Esse pH foi usado para quantificar o cálcio total presente nas amostras, pois nesse pH todas as formas de cálcio estão solubilizadas. Para atingir o pH = 4,0 foi usado ácido clorídrico PA (Synth, São Paulo, Brazil) e em seguida uma pequena alíquota da amostra foi adicionada diretamente no sensor do equipamento LAQUAtwin (Horiba Instruments, Kyoto, Japão).

#### **4.2.5 Distribuição do tamanho das partículas**

Para a análise da distribuição do tamanho das partículas, utilizou-se um analisador de partículas por difração a laser modelo LS 13320 (Beckman Coulter, Califórnia, EUA), equipado com um módulo de dispersão em meio aquoso. As amostras foram adicionadas lentamente e de forma direta ao reservatório do equipamento, até alcançar uma opacidade entre 1% e 3%. Os cálculos dos resultados consideraram os índices de refração de 1,332 para o dispersante (água) e 1,57 para as micelas de caseína. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Beckman Coulter versão 5.03. Os resultados são apresentados como Dv90, que representa o tamanho hidrodinâmico abaixo do qual se encontram 90% das partículas.

#### **4.2.6 Potencial zeta**

O potencial zeta ( $\zeta$ ) foi realizado através do analisador Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido). As amostras foram previamente diluídas em uma razão de 1:250 em água deionizada. Em seguida, as amostras diluídas foram injetadas em uma cubeta e analisadas diretamente no equipamento.

### **4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados são representados na forma de gráficos de barras, que foram construídos utilizando o Origin 2018. Todos os gráficos mostram a média e o desvio padrão dos resultados obtidos em duplicata. Para a análise estatística ANOVA (intervalo de confiança = 95%) dos resultados, foi utilizada a versão 4.2.3 do R, e o Excel 2016 foi utilizado para calcular a correlação de Pearson ( $r$ ) entre Dv90 e a capacidade sequestrante.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

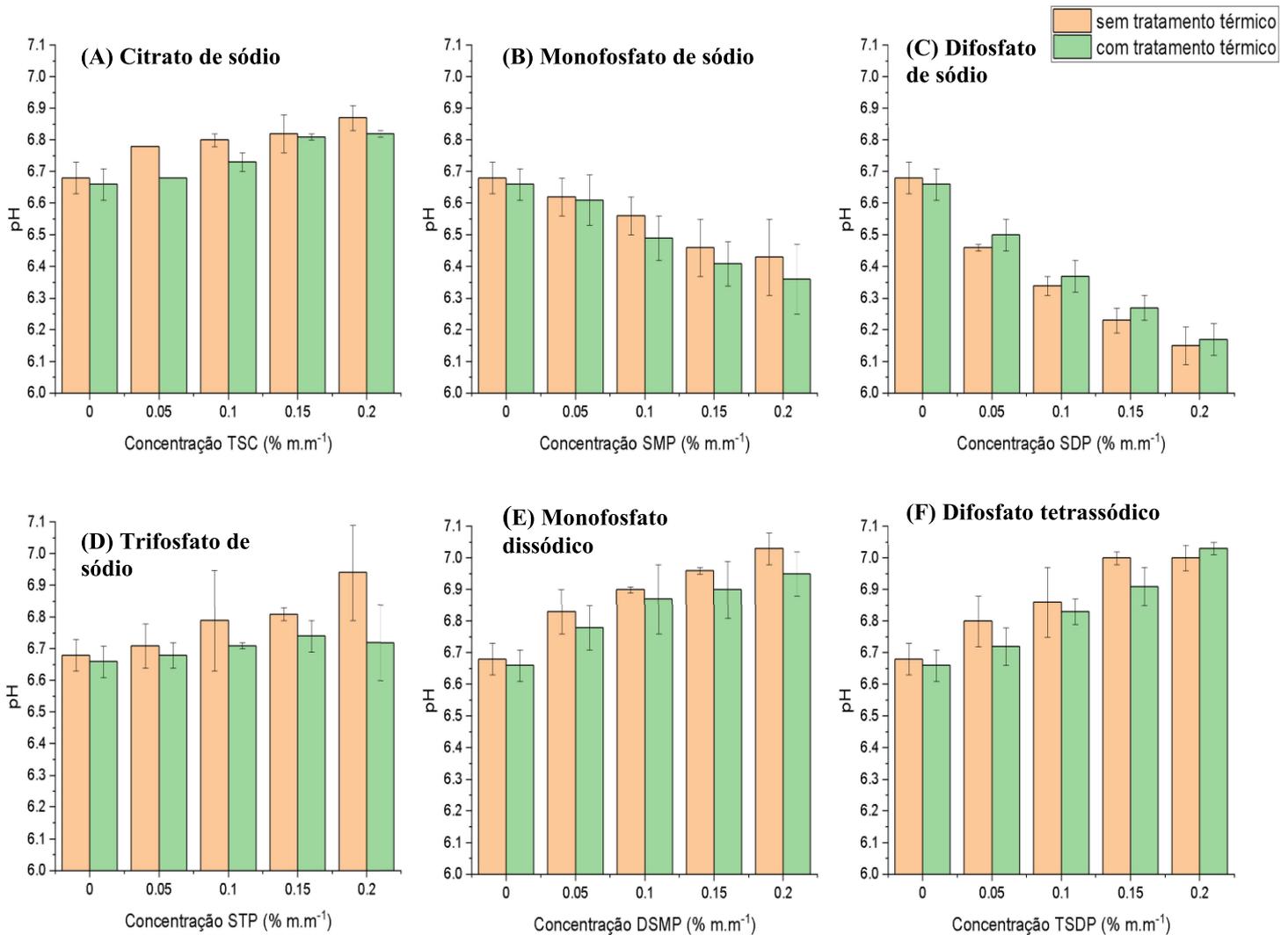
Nas sessões a seguir serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho a partir das análises realizadas. De acordo com os resultados, foi feita uma discussão com base em referências da literatura científica.

### 5.1 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Os valores médios de pH das amostras com várias concentrações de diferentes sais sequestrantes de cálcio são apresentados na Figura 3. O pH das amostras contendo TSC (A), STP (D), DSMP (E) e TSDP (F) tendia a aumentar conforme a concentração do sal aumentava. Isso é diferente dos produtos contendo SMP (B) e SDP (C), nos quais o pH diminuía com o aumento da concentração do sal. Além disso, o SDP (C) apresentou uma maior capacidade de reduzir o pH do que o SMP (B). Não há diferença significativa entre os valores de pH do mesmo sal antes e depois do tratamento térmico ( $p > 0,05$ ).

Tsioulpas *et al.* (2010) adicionaram TSC, SMP e DSMP a amostras de leite desnatado nas mesmas concentrações propostas neste estudo (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20% m.m<sup>-1</sup>), mas submeteram-nas a tratamento térmico a uma temperatura de 121°C por 15 minutos, ou seja, sob condições de esterilização. O mesmo comportamento de aumento do pH para as amostras com adição de TSC e DSMP, e de diminuição do pH para as amostras com adição de SMP, foi relatado pelos autores citados. Gao *et al.* (2010) relataram que a adição de TSDP ao leite ultrafiltrado aumentou o pH mais do que quando STP foi adicionado, pois o TSDP é mais básico. Isso também foi confirmado pelos resultados apresentados neste estudo. Além disso, as tendências de aumento e diminuição do pH são consistentes com os valores de pH relatados por Maurer-Rothmann e Scheurer (2005) para soluções aquosas a 1% de TSC e os efeitos no pH induzidos pelos cinco fosfatos adicionados no presente estudo.

Figura 3 - pH das amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m<sup>-1</sup>, sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).



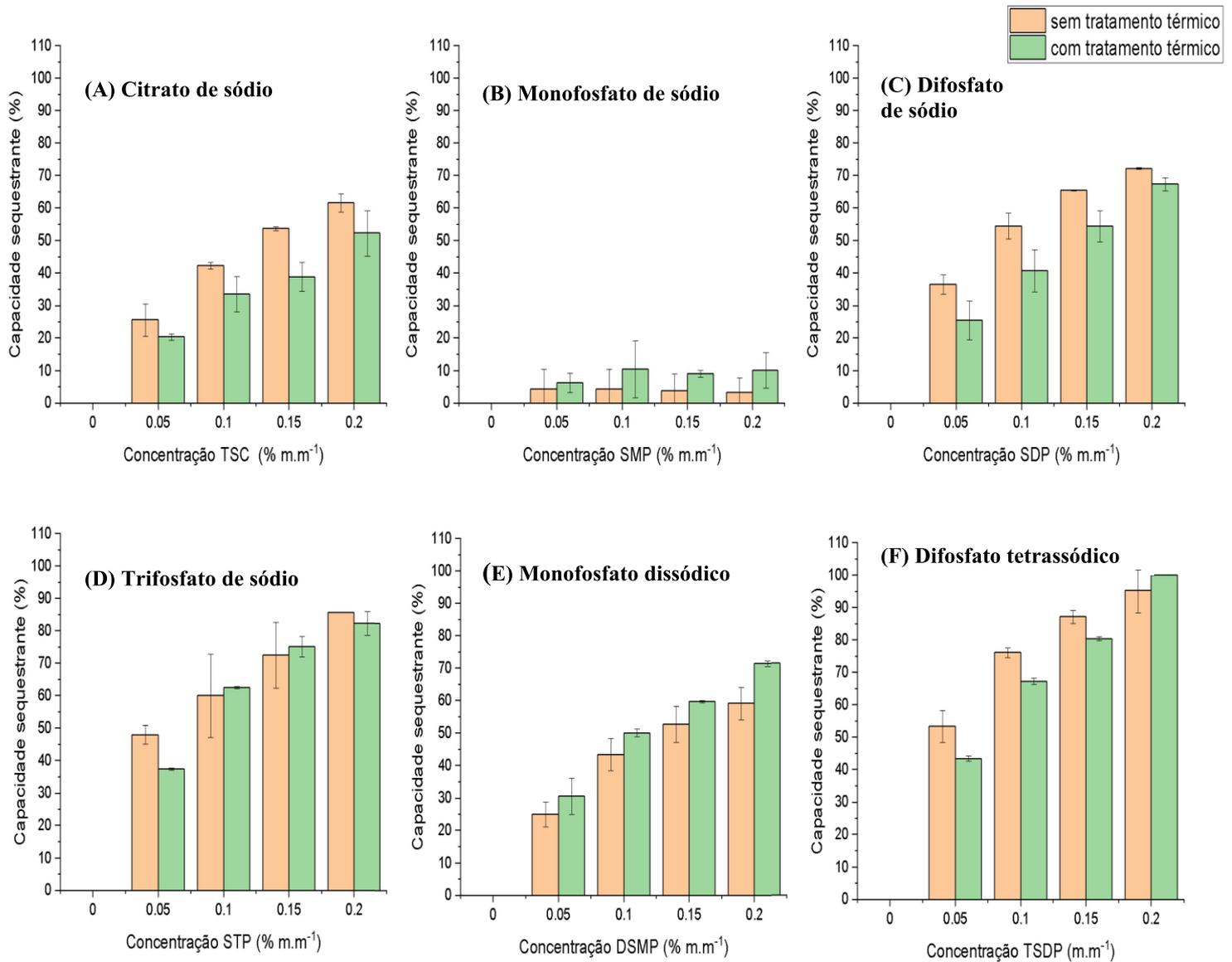
Fonte: Campos *et al.* (2024).

## 5.2 CAPACIDADE SEQUESTRANTE

A capacidade sequestrante média das amostras com várias concentrações de diferentes sais sequestrantes de cálcio é apresentada na Figura 4. A capacidade de sequestro tendia a aumentar de forma dependente da concentração, demonstrando que os sais sequestrantes geralmente tendem a reduzir o teor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Na maioria dos casos, ocorre uma diminuição do cálcio livre após o tratamento térmico, o que já foi descrito na literatura científica, pois o cálcio solúvel é deslocado para a fase coloidal com a precipitação do fosfato tricálcico, devido à baixa solubilidade desse sal em altas temperaturas (Da Silva, 2003). Por outro lado, a adição de monofosfato de sódio (B) teve pouco efeito sobre a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  antes e depois do tratamento térmico ( $p > 0,05$ ). Resultados semelhantes foram relatados por Tsioulpas *et al.* (2010).

Entre os sais estudados, o difosfato tetrassódico (F) apresentou a maior capacidade de sequestro em comparação com os demais sais. Esse sal também foi responsável pelo maior aumento no pH. De acordo com os estudos de Deshwal *et al.* (2024) e Tsioulpas *et al.* (2010), a diminuição da atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  depende da capacidade de sequestro do sal, mas também há uma relação com o efeito do pH. Nesse sentido, Tsioulpas, Lewis e Grandison (2007) relataram que o aumento do pH do leite reduz a concentração de íons cálcio. De Kort *et al.* (2012) associaram a diminuição da atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  ao aumento da formação de complexos de fosfato de cálcio.

Figura 4 - Capacidade sequestrante (%) das amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20%  $m.m^{-1}$ , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).



Fonte: Campos *et al.* (2024).

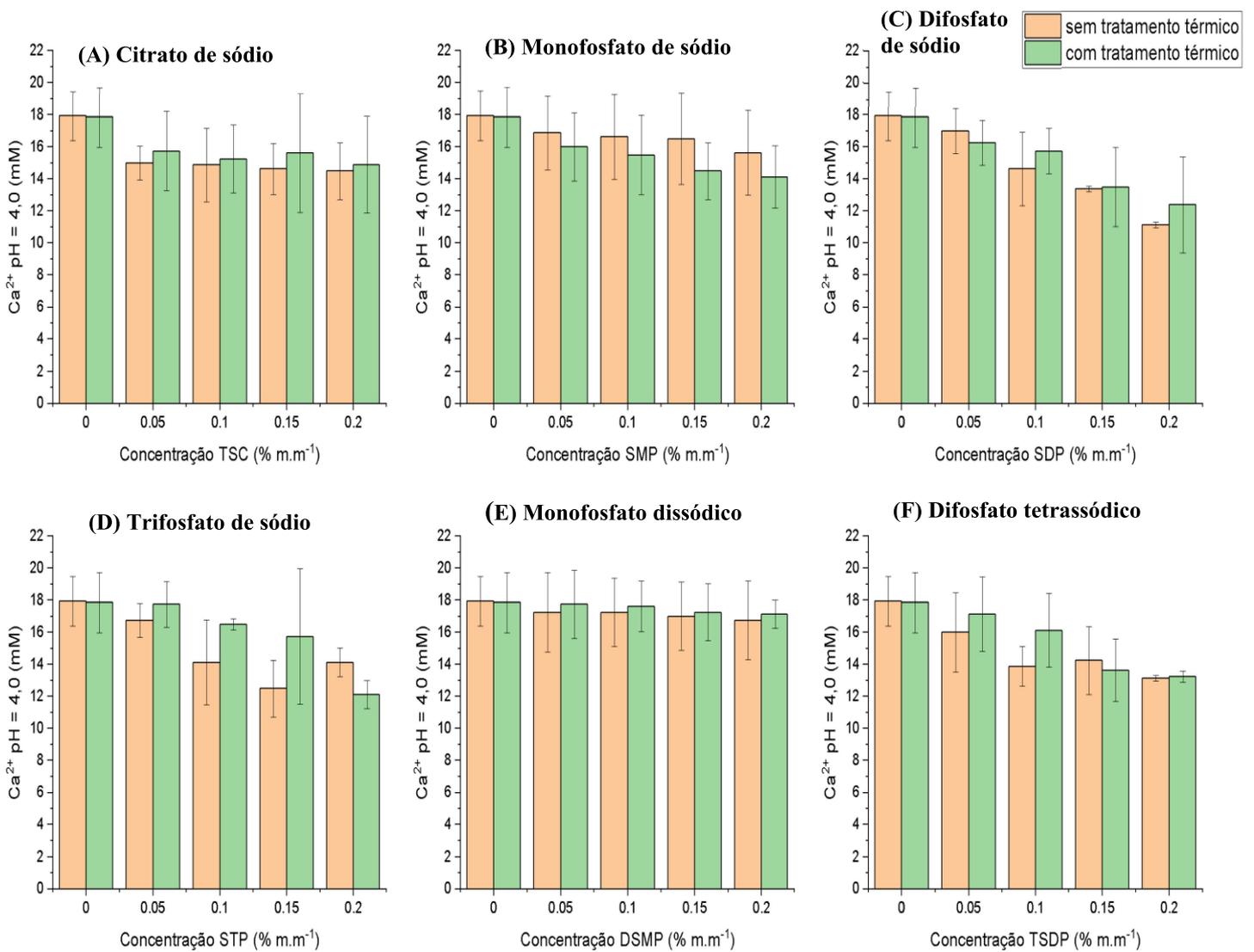
### 5.3 CÁLCIO IÔNICO EM pH = 4,0

Os resultados médios de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH = 4,0 para as amostras com várias concentrações de diferentes sais sequestrantes de cálcio são apresentados na Figura 5. O  $\text{Ca}^{2+}$  (pH = 4,0) foi utilizado para quantificar o cálcio total presente nas amostras, como uma forma de avaliar se os sais sequestrantes adicionados nas concentrações propostas tiveram alguma influência no balanço de cálcio em um pH próximo à faixa do ponto isoelétrico das caseínas (pH~4,6 – 4,7).

O teor de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH = 4,0 depende da concentração dos sais estudados, já que em alguns casos ocorreu uma diminuição no teor de cálcio em comparação com o controle, especialmente na concentração de 0,20% m.m<sup>-1</sup>. Isso sugere que alguns sais sequestrantes influenciaram o balanço de cálcio em pH = 4,0. Os sais responsáveis por essa diminuição significativa foram o difosfato de sódio e o difosfato tetrassódico antes do tratamento térmico ( $p < 0,05$ ). Os demais sais mantiveram o teor de  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 com alterações mínimas.

Os grupos fosfato e citrato presentes no leite tornam-se mais protonados à medida que o pH diminui (Wolfschoon Pombo; Böttger; Lösche, 2012). De acordo com Gaucheron (2005), o fosfato de cálcio coloidal é solubilizado em pH 5,2, enquanto o cálcio é completamente solubilizado em pH 3,5. Mekmene *et al.* (2010) desenvolveram um modelo teórico para estudar o equilíbrio salino no leite em função do pH. No estudo citado, observou-se que o cálcio não era completamente solubilizado e formava um complexo (provavelmente um par iônico como  $\text{CaCl}^+$ ) à medida que o pH diminuía.

Figura 5 - Teor de  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 (mM) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20%  $\text{m.m}^{-1}$ , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).



Fonte: Campos *et al.* (2024).

#### 5.4 TEMPO DE COAGULAÇÃO PELO CALOR (HCT)

A média do HCT das amostras com várias concentrações de diferentes sais sequestrantes de cálcio é apresentada na Figura 6. A estabilidade térmica do leite é influenciada por vários fatores, incluindo o pH e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (Huppertz, 2016; Nieuwenhuije; Huppertz, 2022).

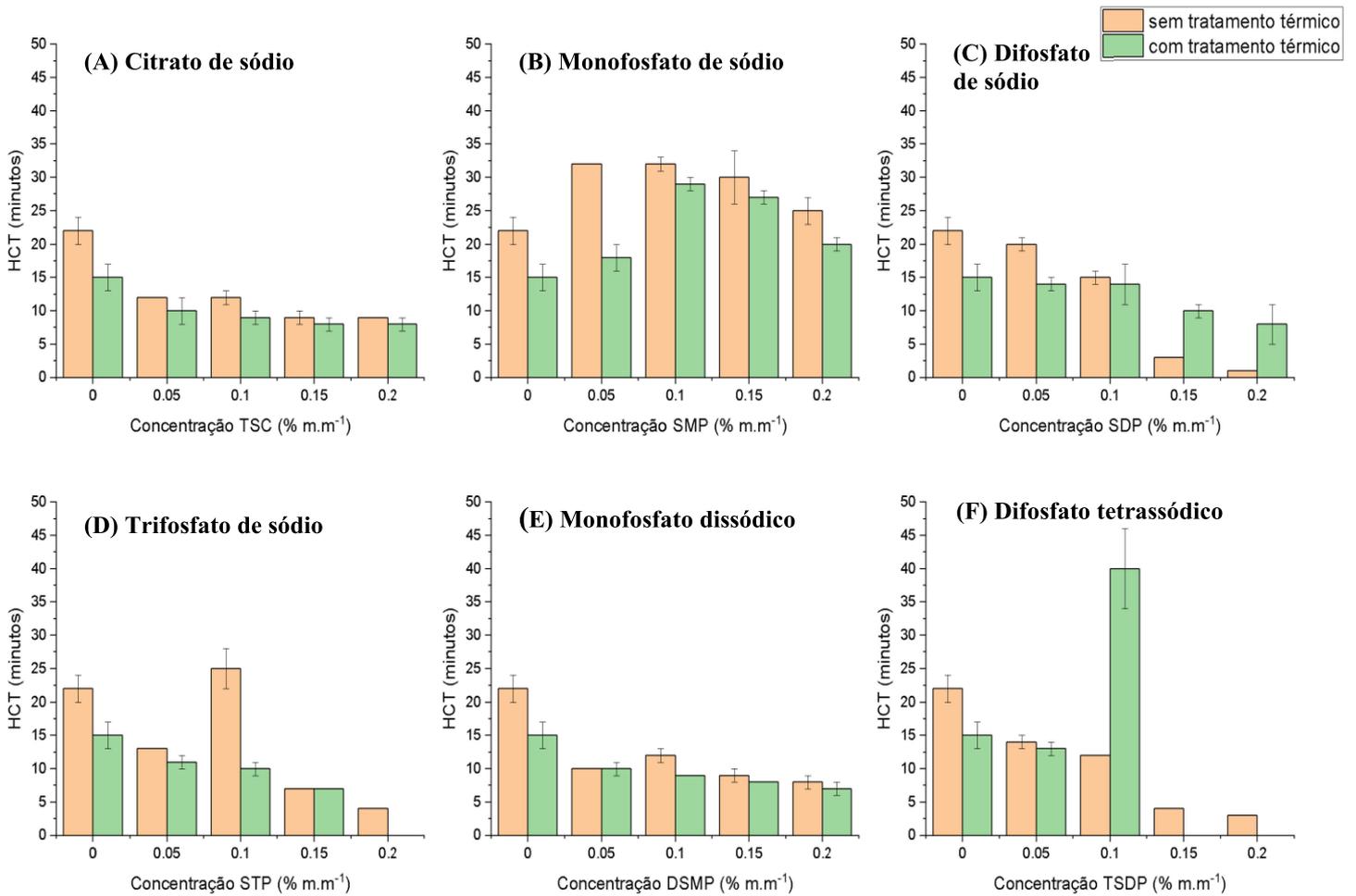
A adição dos sais SDP (C), STP (D) e TSDP (F) reduziu o HCT nas concentrações de 0,15 e 0,20% m.m<sup>-1</sup>. As amostras com adição de STP (D) e TSDP (F) apresentaram HCT de 0 minutos na concentração de 0,20% m.m<sup>-1</sup> após o tratamento térmico. Isso indicou que a amostra coagulou antes de ser submetida às condições de temperatura do HCT. O difosfato tetrassódico foi o sal com maior capacidade de sequestrar  $\text{Ca}^{2+}$ , além de aumentar o pH.

A presença de agregados (coagulação) e a baixa estabilidade térmica estão relacionadas às interações entre proteínas. Segundo Horne (2017), interações hidrofóbicas estão envolvidas na agregação das caseínas. A instabilidade térmica do leite também está associada à dissociação da  $\kappa$ -caseína induzida pelo calor, que ocorre em níveis elevados de pH (Anema, 2021). Além disso, a diminuição da estabilidade térmica pode ser causada pela precipitação de Ca e  $\text{PO}_4$  nas micelas de caseína durante o tratamento térmico, aumentando assim os níveis de fosfato de cálcio coloidal (Nieuwenhuije; Huppertz, 2022; Ahmadi; Huppertz; Vasiljevic, 2024). Portanto, as alterações no HCT podem estar associadas às variações no teor de fosfato de cálcio coloidal.

As amostras com adição de TSC (A) e DSMP (E) nas concentrações estudadas apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle, antes e depois do tratamento térmico ( $p < 0,05$ ). No entanto, as amostras com adição dos sais (TSC (A) e DSMP (E)) não apresentaram diferença significativa entre as concentrações estudadas (0,05, 0,10, 0,15 e 0,20%) antes e depois do tratamento térmico ( $p > 0,05$ ). O citrato de sódio e o monofosfato dissódico demonstraram capacidade de modular o pH e apresentaram aumento na capacidade de sequestro de maneira dependente da concentração. Embora esses sais demonstrem características semelhantes, conforme mencionado acima, eles podem atuar de forma diferente na estrutura coloidal do leite. Garcia *et al.* (2023) relataram que a adição de CCS pode causar a ruptura micelar. Os autores sugerem que a adição de citrato de sódio causa ruptura devido ao sequestro do cálcio micelar. Dessa forma, os *nanoclusters* de fosfato de cálcio coloidal são desfeitos. No entanto, o fósforo proveniente da adição de fosfato pode competir com o fósforo inorgânico dentro das micelas de caseína, também causando ruptura micelar. Portanto, esses diferentes mecanismos de ação sobre as micelas de caseína podem estar influenciando a estabilidade térmica do leite desnatado.

De acordo com Dumpler e Kulozik (2015), o leite desnatado com 10% de sólidos totais apresentou HCT máximo em pH 6,7. No trabalho citado, os autores mostraram que o HCT tende a diminuir em valores de pH acima de 7,0 e abaixo de 6,4. Nesse sentido, a amostra com adição de difosfato tetrassódico (F) apresentou aumento na estabilidade térmica na concentração de 0,10% (após o tratamento térmico). Nessa concentração, a amostra apresentou pH de  $6,83 \pm 0,04$ , situando-se, portanto, dentro da faixa de pH definida por Dumpler e Kulozik (2015), na qual há aumento da estabilidade térmica.

Figura 6 - Tempo de coagulação térmica (HCT, minutos) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20% m.m<sup>-1</sup>, sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).



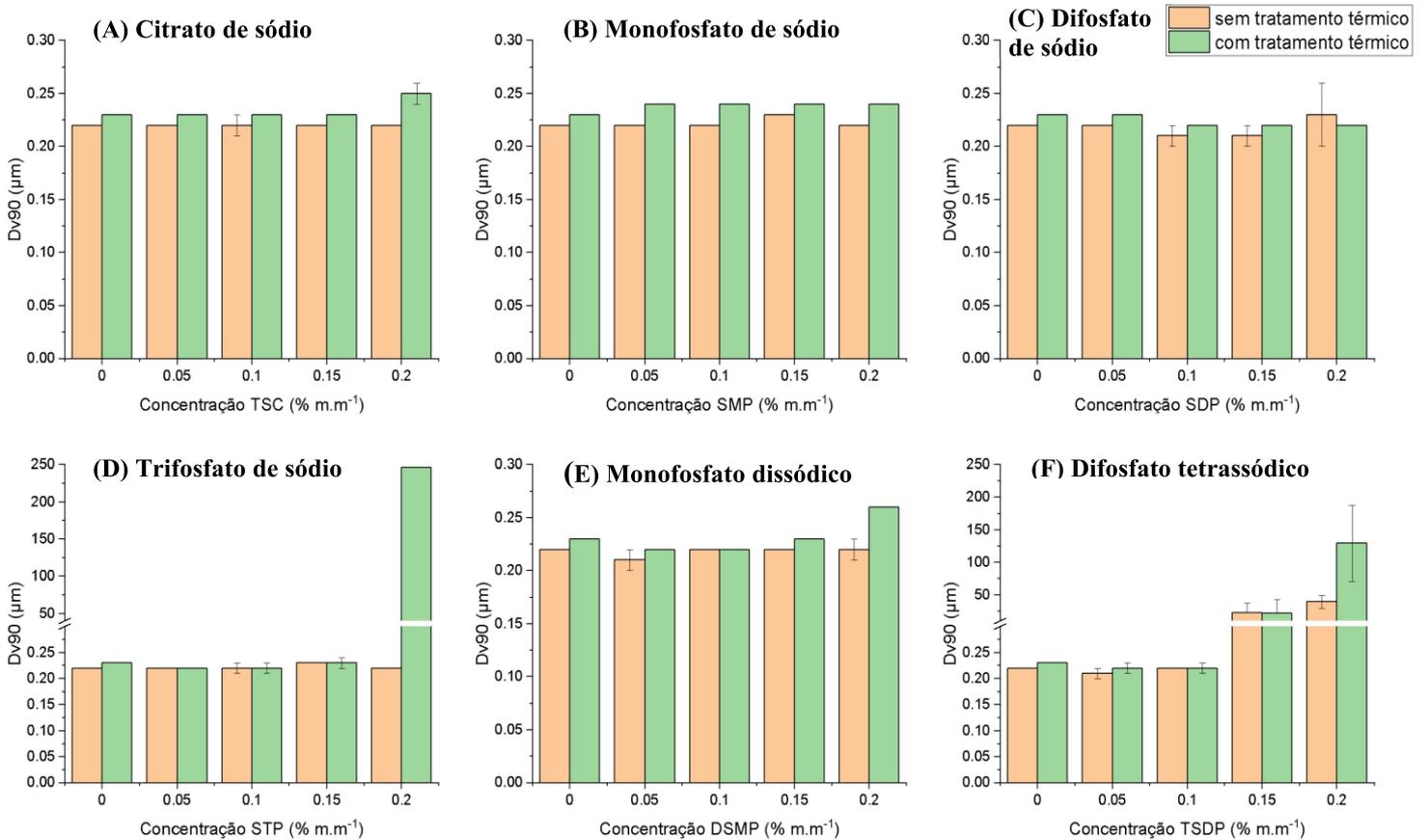
Fonte: Campos *et al.* (2024).

## 5.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS

A Figura 7 mostra o tamanho hidrodinâmico médio correspondente a 90% das partículas ( $Dv_{90}$ ) das amostras com várias concentrações de diferentes sais sequestrantes de cálcio. Os valores de  $Dv_{90}$  foram semelhantes para a maioria das amostras, exceto no caso das amostras com adição de trifosfato de sódio (D) e difosfato tetrassódico (F). A amostra com adição de STP (D) apresentou um aumento no  $Dv_{90}$  apenas após o tratamento térmico na concentração de 0,20%  $m.m^{-1}$ , enquanto a amostra suplementada com TSDP (F) também apresentou um aumento no  $Dv_{90}$ , mas isso ocorreu nas concentrações de 0,15 e 0,20%  $m.m^{-1}$  antes ( $r = 0,65$ ) e depois do tratamento térmico ( $r = 0,86$ ).

Tsioulpas *et al.* (2010) sugeriram que o tamanho das micelas de caseína pode ser influenciado pelo  $Ca^{2+}$ , já que a redução de  $Ca^{2+}$  em amostras de leite tratadas termicamente resultou em um aumento no tamanho das micelas. Com base nos resultados apresentados, pode-se sugerir que a distribuição do tamanho das partículas (PSD) é influenciada pelo  $Ca^{2+}$ , pois o sal com maior capacidade de sequestro, o TSDP (F), é responsável pelas principais alterações no  $Dv_{90}$ .

Figura 7 -  $Dv_{90}$  (diâmetro hidrodinâmico no qual 90% das partículas estão distribuídas) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20%  $m.m^{-1}$ , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).



Fonte: Campos *et al.* (2024).

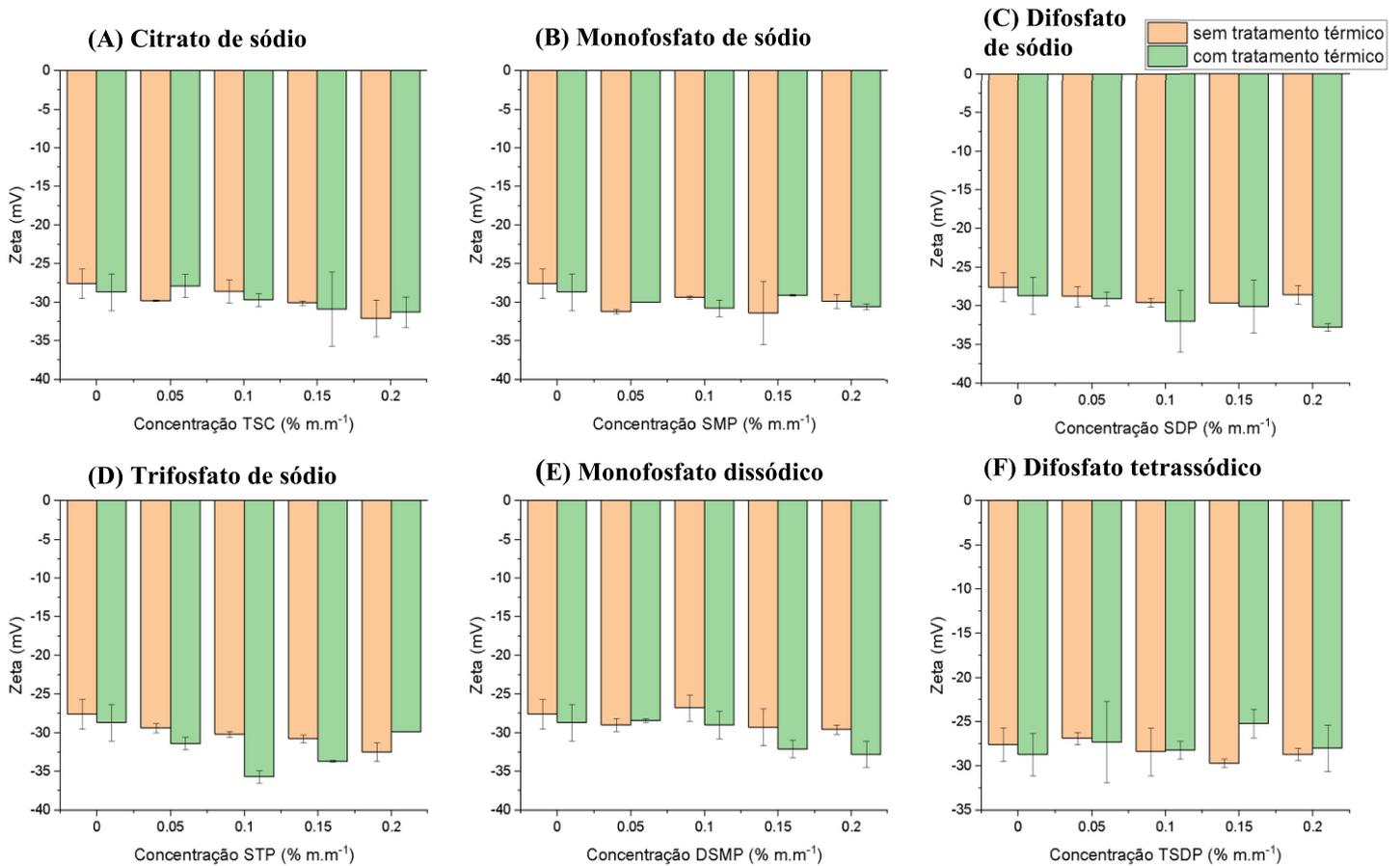
## 5.6 POTENCIAL ZETA

A Figura 8 mostra os resultados médios do potencial  $\zeta$  para as amostras com as concentrações de sais sequestrantes de cálcio testadas. O leite contém partículas eletricamente carregadas, incluindo micelas de caseína e glóbulos de gordura, que interagem entre si (Gaucher *et al.*, 2008). O objetivo da determinação do potencial  $\zeta$  é, portanto, avaliar a estabilidade do leite por meio da determinação da carga elétrica líquida do sistema. A estabilidade de soluções com diferentes valores de potencial  $\zeta$  (em mV) é definida da seguinte forma:  $\pm 0-10$  (muito instável),  $\pm 10-20$  (relativamente estável),  $\pm 20-30$  (moderadamente estável) e  $\pm 30$  mV (altamente estável) (Cano-Sarmiento *et al.*, 2018).

A Figura 8 mostra que os valores de potencial  $\zeta$  variaram entre -25 e -35 mV para todas as amostras. As variações de pH,  $\text{Ca}^{2+}$  e distribuição do tamanho das partículas induzidas pela adição dos sais sequestrantes não levaram a alterações significativas nos valores de potencial  $\zeta$  das amostras. A energia aplicada ( $F_0$ ) para o tratamento térmico também não alterou significativamente os valores de potencial  $\zeta$  ( $p > 0$ ). Parece que a adição dos sais e o tratamento térmico não induziram mudanças significativas no potencial  $\zeta$ , mantendo os valores dentro da faixa considerada estável.

Anema e Klostermeyer (1996) relataram que o potencial  $\zeta$  para micelas de caseína variou entre -20 e -13 mV na faixa de pH de 8,0 a 4,75. Tsioulpas *et al.* (2010) obtiveram valores de potencial  $\zeta$  entre -31,5 e -25,8 mV para amostras de leite desnatado com adição de citrato de sódio, monofosfato de sódio e monofosfato dissódico, sem tratamento térmico, e observaram uma diminuição no potencial  $\zeta$  (valores mais negativos) após o tratamento térmico a 121 °C por 15 minutos, aumentando assim a repulsão entre as cargas e tornando o sistema mais estável.

Figura 8 - Potencial  $\zeta$  (mV) de amostras de leite desnatado com adição de sais quelantes de cálcio em concentrações de 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20%  $\text{m.m}^{-1}$ , sem e com tratamento térmico: citrato de sódio (A), monofosfato de sódio (B), difosfato de sódio (C), trifosfato de sódio (D), monofosfato dissódico (E) e difosfato tetrassódico (F).



Fonte: Campos *et al.* (2024).

## 6 CONSIDERAÇÕES

Diante dos resultados acima, é possível concluir que os maiores efeitos sobre a estrutura coloidal do leite desnatado foram causados pela adição de difosfato tetrassódico e trifosfato de sódio nas concentrações de 0,15 e 0,20% m.m<sup>-1</sup>, pois foram os que apresentaram maior capacidade de aumentar o pH, sequestrar Ca<sup>2+</sup> e reduzir o HCT, além de influenciarem o equilíbrio do cálcio em pH = 4,0 e também alterarem a distribuição do tamanho das partículas. O potencial  $\zeta$  foi o único parâmetro que não apresentou alterações significativas com a adição de sais quelantes de cálcio e a aplicação de calor.

## 7 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS ESTABILIZANTES NA ESTRUTURA COLOIDAL DE LEITE DESNATADO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE SAIS DE SÓDIO E SAIS DE POTÁSSIO

A partir da seção 7.1 será apresentada uma revisão bibliográfica sintetizando os principais tópicos já abordados no primeiro capítulo, além de trazer novas informações relevantes para a discussão do segundo capítulo.

### 7.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Os sais quelantes de cálcio ou sais sequestrantes de cálcio são amplamente usados em produtos lácteos como, por exemplo, leite UHT, queijo processado, bebidas lácteas, entre outros. Esses sais são aditivos utilizados com o intuito de aumentar a estabilidade térmica e evitar problemas no processamento do leite, solucionando o depósito em trocadores de calor (Gaucheron, 2005).

É possível encontrar na literatura científica estudos referentes ao uso dos sais sequestrantes e seus impactos nos sistemas proteicos do leite. Nesse sentido, há trabalhos incluindo o uso desses sais em concentrado de proteína do leite (Hoyt *et al.*, 2022; Pranata *et al.*, 2023), concentrado de caseína micelar (De Kort *et al.*, 2011; De Kort *et al.*, 2012; Garcia; Alting; Huppertz, 2023a; Garcia; Alting; Huppertz, 2023b), leite desnatado (Tsioulpas *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2024) e misturas de leite bovino e leite de búfala (Mejares; Chandrapala; Huppertz, 2023; Mejares; Huppertz; Chandrapala, 2024).

No leite, os sais quelantes de cálcio diminuem a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na fase solúvel, reduzindo a agregação de proteínas sensíveis ao cálcio e, conseqüentemente, aumentam a estabilidade térmica e o tempo de prateleira (De Kort, 2012). Os sais quelantes de cálcio podem agir de maneiras distintas na estrutura coloidal do leite e de forma dependente da concentração. Há relatos na literatura científica evidenciando que citratos e fosfatos têm diferentes mecanismos de ação nas micelas de caseína (Deshwal *et al.*, 2023; Garcia; Alting; Huppertz, 2023b). Dependendo da concentração usada, esses sais podem dissociar as micelas de caseína e liberar frações de proteína para a fase solúvel (Pitkowski; Nicolai; Durand, 2008). Além disso, há uma competição pelos íons cálcio entre o fosfato proveniente dos CCS e o fosfato inorgânico do fosfato de cálcio coloidal. Isso pode comprometer a estrutura micelar, visto que fosfato de cálcio coloidal desempenha um importante papel na manutenção da integridade micelar (Garcia; Alting; Huppertz, 2023b).

A legislação brasileira permite o uso de 4 sais sequestrantes de cálcio para uso em leite UHT (*Ultra-High-Temperature*), sendo eles: citrato de sódio (331iii), monofosfato de sódio (339i), difosfato de sódio (450i) e trifosfato de sódio (451i), podendo ser adicionados de forma separada ou em combinação, em uma quantidade não superior a  $0,1 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  expressos em  $\text{P}_2\text{O}_5$  (Brasil, 2025). Também é permitido pela legislação brasileira o uso de alguns sais sequestrantes de cálcio em bebidas lácteas UHT, sendo eles: citrato trissódico (331iii), citrato tripotássico (332ii), monofosfato de monossódico (339i), monofosfato dissódico (339ii), monofosfato trissódico (339iii), monofosfato monopotássico (340i) e monofosfato dipotássico (340ii) (Brasil, 2023).

No Brasil, entrou em vigor, no ano de 2022, a nova rotulagem dos alimentos definida pela Instrução Normativa n° 75 e pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 429, ambas de 2020. A nova rotulagem exige que seja declarado na parte frontal do rótulo os altos teores de açúcar adicionado, gordura saturada e sódio. Nesse sentido, há um movimento da indústria para reduzir o teor de sódio adicionado nos alimentos. Uma alternativa viável é a substituição de aditivos que contém sódio por aditivos que contém potássio. Entretanto a troca do íon pode ocasionar mudanças nas interações químicas do produto.

Recentemente, Deshwal *et al.* (2023) revisaram o efeito dos sais sequestrantes de cálcio nas micelas de caseína (sistemas lácteos para processamento de queijo), destacando o papel dos fosfatos (de sódio) e citratos. Esses últimos autores mencionaram que a substituição do cátion  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$  resulta em menor ligação catiônica e, conseqüentemente, em maior pH e hidratação proteica; mais de 50% de substituição de  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$  nos sais sequestrantes levou a certos defeitos na qualidade sensorial. Não temos conhecimento de relatos sobre como uma troca iônica (sódio  $\leftrightarrow$  potássio) nos sais sequestrantes afeta o tempo de coagulação térmica (HCT) e outras propriedades coloidais do leite desnatado. Nesse sentido, é extremamente importante estudar a influência dos sais sequestrantes de cálcio em diferentes concentrações na estrutura coloidal do leite. Esse tipo de estudo pode auxiliar a indústria de laticínios a escolher o melhor aditivo para seu produto, impactando diretamente na melhoria da estabilidade térmica e no aumento da vida de prateleira. Além disso, o estudo pode ajudar a reduzir a quantidade desse aditivo utilizado pela indústria láctea. Portanto, o presente estudo compara a influência de sais quelantes de cálcio compostos por diferentes cátions ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) – ânions fosfato e citrato de sódio – no tempo de coagulação térmica, volume hidrodinâmico ( $Dv_{90}$ ), distribuição de tamanho de partículas, pH e capacidade de sequestro de amostras de leite desnatado tratadas termicamente ou não.

## 8 METODOLOGIA

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

### 8.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

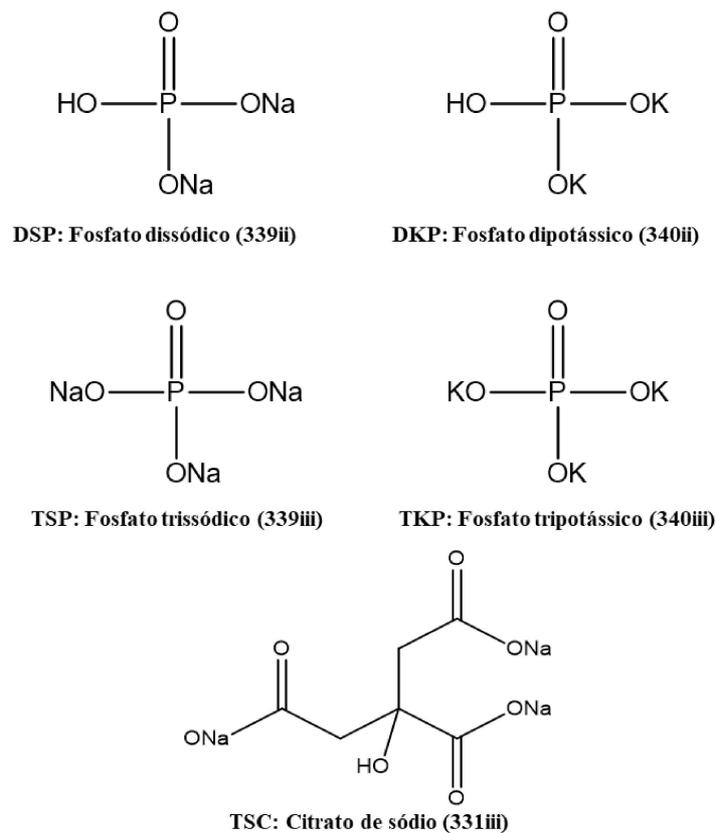
O preparo das amostras seguiu a metodologia descrita por Campos *et al.* (2024) que partiu de leite em pó desnatado de baixo tratamento térmico com o intuito de garantir que o experimento fosse executado com réplicas, observando sua reprodutibilidade. O leite em pó desnatado (Land O'Lakes, Inc., Minnesota, Estados Unidos) usado no preparo das amostras obteve a seguinte composição físico-química: gordura 0,74%, umidade 3,28%, proteína 38,63% e *whey protein nitrogen index* (WPNI) 7,80 mgN.g<sup>-1</sup>. O pó foi reconstituído com água deionizada em temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) para 9% m.m<sup>-1</sup> de sólidos totais e foi armazenado em geladeira (8 °C) por 24 horas, garantindo sua completa solubilização. Após esse tempo, as análises físico-químicas foram feitas através do analisador de leite ultrassônico portátil Ekomilk (Cap-Lab, São Paulo, Brasil) e obteve a seguinte composição: gordura  $0,24 \pm 0,07\%$ , extrato seco desengordurado (ESD)  $9,40 \pm 0,56\%$ , densidade  $1,034 \pm 0,002$  g.mL<sup>-1</sup>, proteína  $3,66 \pm 0,21\%$ , lactose  $4,72 \pm 0,30\%$ .

A partir do leite reconstituído, foram preparadas amostras com a adição dos sais: citrato de trissódico (TSC), fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP) e fosfato tripotássico (TKP). As estruturas químicas desses sais estão dispostas na Figura 9. Os sais foram adquiridos da ICL Food Specialties South America (São Paulo, Brasil). As concentrações usadas para cada sal foi de 0,00 (controle); 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20% (m.m<sup>-1</sup>). A Tabela 5 apresenta a fórmula molecular e o INS (*International Food Additive Numbering System*) dos sais quelantes de cálcio usados no trabalho e a Tabela 6 apresenta a conversão das concentrações de cada sal de % (m.m<sup>-1</sup>) para mM.

As amostras foram submetidas ao tratamento térmico em banho de óleo a 155 °C por 8 minutos ( $F_0 = 1,43$  minutos). Um exemplo de curva de tratamento térmico foi apresentado na Figura 2 (seção 4.1). Em seguida, elas foram resfriadas em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C). O valor de  $F_0$  foi feito através da calculadora para determinação da letalidade e alterações químicas em produtos UHT utilizando a regra de Simpson disponível em Mullan (2018).

As amostras sem tratamento térmico foram submetidas às análises de pH, capacidade sequestrante e tempo de coagulação pelo calor (HCT). Após a aplicação do tratamento térmico, foram feitas as mesmas análises citadas anteriormente, além da distribuição do tamanho das partículas e teor de cálcio em pH = 4,0. A Figura 10 resume o delineamento experimental. Os procedimentos para realização de cada análise estão descritos abaixo.

Figura 9 - Estrutura química dos sais quelantes de cálcio usados no estudo.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Tabela 5 - Nomenclaturas, fórmula molecular e INS (*International Food Additive Numbering System*) dos sais quelantes de cálcio usados no estudo.

Sais	Nomenclaturas	Fórmula molecular	INS
DSP	Fosfato dissódico, monofosfato dissódico ou hidrogeno fosfato dissódico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	339ii
DKP	Fosfato dipotássico, monofosfato dipotássico ou hidrogeno fosfato dipotássico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	340ii
TSP	Fosfato trissódico ou monofosfato trissódico	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	339iii
TKP	Fosfato tripotássico ou monofosfato tripotássico	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	340iii
TSC	Citrato trissódico ou citrato de sódio	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	331iii

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

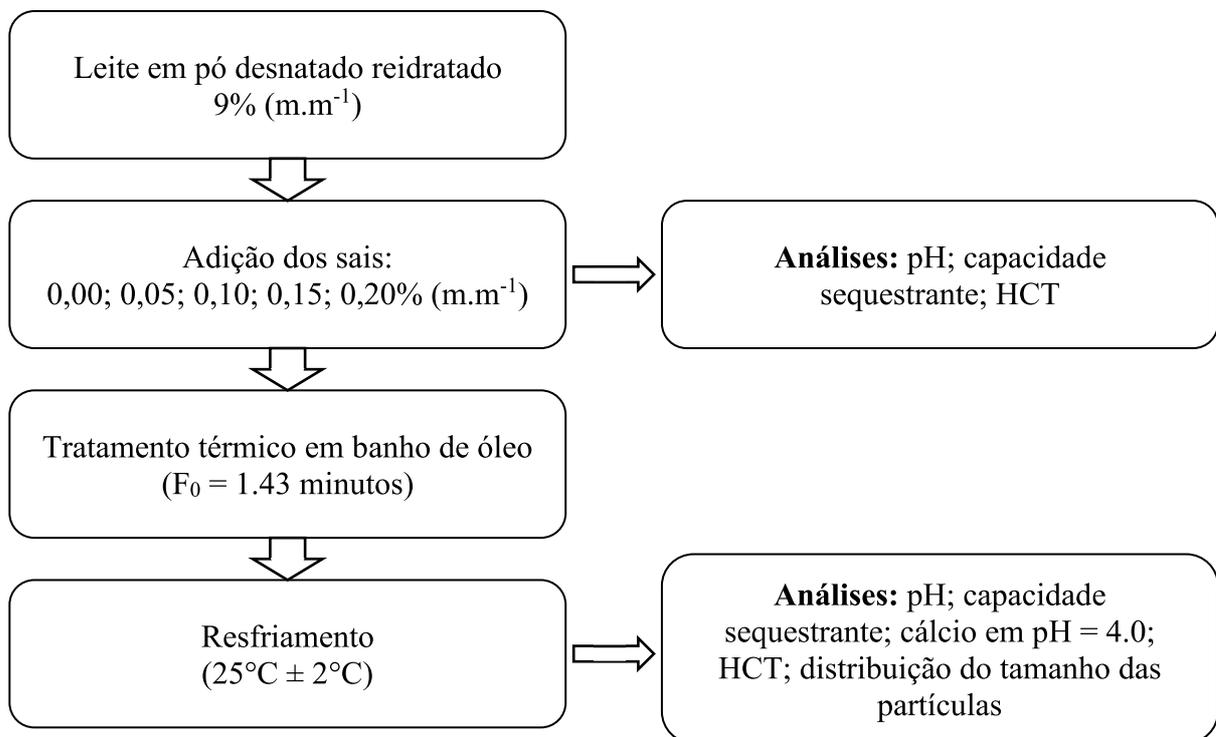
Tabela 6 - Conversão das concentrações dos sais em % (m.m<sup>-1</sup>) para mM.

Sais*	mM			
	0,05%	0,10%	0,15%	0,20%
DSP	3,52	7,04	10,57	14,09
DKP	2,87	5,74	8,61	11,48
TSP	3,05	6,10	9,15	12,20
TKP	2,36	4,71	7,07	9,42
TSC	1,94	3,88	5,81	7,75

\*Fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP), fosfato tripotássico (TKP), citrato trissódico (TSC).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Figura 10 - Delineamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 8.2 ANÁLISES

As análises realizadas para a execução desse segundo capítulo são as mesmas descritas nas seções 4.2.1 (pH), 4.2.2 (capacidade sequestrante), 4.2.3 (HCT), 4.2.4 (Cálcio iônico em pH = 4,0) e 4.2.5 (distribuição do tamanho das partículas).

## 8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Tukey (testes de comparação múltipla e faz comparações entre todos os pares) foi utilizado para análises estatísticas com nível de significância de 0,05 no software R, versão 4.3.3. Os resultados dispostos nas tabelas encontram-se na forma de média seguida de seu respectivo desvio padrão (média ± desvio padrão).

## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas sessões a seguir serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho a partir das análises realizadas. De acordo com os resultados, foi feita uma discussão com base em referências da literatura científica.

### 9.1 POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH)

Na Tabela 7 estão dispostos os valores de pH das amostras sem e com tratamento térmico, respectivamente. Ao comparar a adição do sal DSP com a adição do DKP, observa-se que, estatisticamente, não há diferença de pH entre as amostras adicionadas de sal de sódio e as amostras adicionadas de sal de potássio, independente da concentração. O mesmo acontece se for comparado a adição do sal TSP com a adição do sal TKP. Portanto, não há mudança de pH nas amostras quando o íon sódio é trocado pelo íon potássio. Entretanto, observa-se que a adição de TSP e TKP tem um aumento significativo de pH se comparado à adição de DSP e DKP, principalmente nas concentrações a partir de 0,10%. Ambos os fatos são observados para as amostras sem e com tratamento térmico.

Na ausência de tratamento térmico, o pH das amostras adicionadas de TSC possui comportamento semelhante quando comparado ao pH das amostras adicionadas de DSP e DKP em todas as concentrações estudadas. Entretanto, o pH das amostras com adição de TSC se difere do pH das amostras com adição de TSP e TKP a partir da concentração de 0,10%. Já quando é aplicado o tratamento térmico, o pH das amostras adicionadas de TSC passa a ser diferente do pH das amostras adicionadas de DSP e DKP e das amostras adicionadas de TSP e TKP nas concentrações de 0,15 e 0,20%.

Os efeitos de pH provocados pela adição de TSC e dos diferentes fosfatos analisados neste estudo estão em concordância com os valores de pH relatados por Maurer-Rothmann e Scheurer (2005) para soluções aquosas a 1% dos respectivos sais. Pranata *et al.* (2023) observaram pHs de 7,04 e 7,08 para amostras de concentrado de caseína micelar e concentrado de proteína do leite, respectivamente, após a adição de DKP a uma concentração de 0,15%.

Tabela 7 - pH das amostras sem e com tratamento térmico.

<b>pH (sem tratamento térmico)*</b>					
<b>Sais**</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	6,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,68 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,75 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,82 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,86 ± 0,01 <sup>b</sup>
DKP	6,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,71 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,77 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,82 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,88 ± 0,01 <sup>b</sup>
TSP	6,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,78 ± 0,06 <sup>ab</sup>	7,01 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,24 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,52 ± 0,12 <sup>a</sup>
TKP	6,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,87 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,05 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,22 ± 0,00 <sup>a</sup>	7,37 ± 0,02 <sup>a</sup>
TSC	6,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,78 ± 0,00 <sup>ab</sup>	6,80 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,82 ± 0,06 <sup>b</sup>	6,87 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>pH (com tratamento térmico)*</b>					
<b>Sais**</b>	<b>0.00%</b>	<b>0.05%</b>	<b>0.10%</b>	<b>0.15%</b>	<b>0.20%</b>
DSP	6,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,64 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,69 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,72 ± 0,01 <sup>c</sup>
DKP	6,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,62 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,70 ± 0,02 <sup>c</sup>	6,74 ± 0,01 <sup>c</sup>
TSP	6,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,72 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,89 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,24 ± 0,01 <sup>a</sup>
TKP	6,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,73 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,92 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
TSC	6,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,68 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,73 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,81 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,82 ± 0,01 <sup>b</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra, em diferentes sais, não diferiram significativamente entre si no teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*\*Fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP), fosfato tripotássico (TKP), citrato trissódico (TSC).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 9.2 CAPACIDADE SEQUESTRANTE

Na Tabela 8 estão dispostos os valores de capacidade sequestrante das amostras sem e com tratamento térmico, respectivamente. Os resultados mostram que a capacidade sequestrante tende a aumentar conforme a concentração, indicando que os sais sequestrantes causam uma redução no conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  da fase solúvel, conforme já é descrito na literatura científica (Tsioulpas *et al.*, 2010; McIntyre; O'Sullivan; O'Riordan, 2016; Mejares; Chandrapala; Huppertz, 2023; Campos *et al.*, 2024).

Os resultados também revelam que a troca do íon sódio pelo íon potássio não altera de forma significativa a capacidade sequestrante. Tal fato foi observado nos dois pares comparados

(DSP/DKP e TSP/TKP) na presença e na ausência de tratamento térmico. O mesmo fato foi relatado por McIntyre, O'Sullivan and O'Riordan (2016) para soluções de  $\text{CaCl}_2$  em uma concentração de  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ . Observa-se também que a adição de TSP e TKP possui a capacidade sequestrante significativamente maior se comparada à adição de DSP e DKP, principalmente nas concentrações de 0,15 e 0,20% sem tratamento térmico. Ao aplicar o tratamento térmico, essa característica se mantém apenas na concentração de 0,15%. O aumento da capacidade sequestrante do par TSP/TKP está associado ao aumento de pH registrado por esses sais, visto que a capacidade de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  com os sais sequestrantes é influenciada pelo pH (Tsioulpas; Lewis; Grandison 2007; De Kort *et al.*, 2009; Tsioulpas *et al.*, 2010). Em pHs mais elevados, a dissociação das moléculas de fosfato de sódio é mais eficiente, pois acarreta a formação de ânions com maior valência. Esse processo resulta em uma maior eficiência na ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ , já que os ânions de maior valência têm maior capacidade de interagir com os cátions de cálcio (Van Wazer, 1971; McIntyre; O'Sullivan; O'Riordan, 2016).

As amostras adicionadas de TSC possuem capacidade sequestrante estatisticamente diferente das amostras adicionadas de TSP e TKP a partir da concentração de 0,10% na ausência de tratamento térmico. Quando o tratamento térmico foi aplicado, o comportamento se manteve, entretanto na concentração de 0,15% o valor da capacidade sequestrante tornou-se significativamente diferente dos pares DSP/DKP e TSP/TKP.

A literatura científica descreve que os sais sequestrantes diminuem a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na fase solúvel, pois esses sais têm a capacidade de formar complexos com cátions metálicos (Holt; Dalglish; Jenness, 1981; Holt, 2004; Bauland; Gaucheron; Croguennec, 2022). Nesse sentido o trabalho de McIntyre, O'Sullivan e O'Riordan (2016) sugere que o complexo formado depende do sal sequestrante usado. Os autores citados relatam que a adição de DSP forma complexos insolúveis de fosfato de cálcio que precipitam (por exemplo,  $\text{CaHPO}_4$  ou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), enquanto a adição de TSC forma complexos de citrato de cálcio solúveis.

Tabela 8 - Capacidade sequestrante (%) das amostras sem e com tratamento térmico.

<b>Capacidade Sequestrante (sem tratamento térmico)*</b>				
<b>Sais**</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	23,9 ± 2,1 <sup>a</sup>	43,9 ± 3,0 <sup>abc</sup>	54,7 ± 2,9 <sup>a</sup>	63,0 ± 1,6 <sup>ab</sup>
DKP	25,0 ± 13,0 <sup>a</sup>	38,4 ± 8,3 <sup>c</sup>	49,1 ± 7,5 <sup>a</sup>	57,8 ± 2,3 <sup>a</sup>
TSP	36,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	59,7 ± 6,5 <sup>a</sup>	74,6 ± 5,6 <sup>b</sup>	90,1 ± 14,0 <sup>c</sup>
TKP	41,7 ± 6,6 <sup>a</sup>	60,7 ± 2,0 <sup>a</sup>	76,1 ± 1,1 <sup>b</sup>	85,3 ± 0,1 <sup>c</sup>
TSC	25,6 ± 5,0 <sup>a</sup>	42,3 ± 1,1 <sup>bc</sup>	53,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	61,7 ± 2,8 <sup>ab</sup>
<b>Capacidade sequestrante (com tratamento térmico)*</b>				
<b>Sais**</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	29,1 ± 3,3 <sup>a</sup>	46,4 ± 0,1 <sup>abc</sup>	56,4 ± 1,4 <sup>ab</sup>	70,0 ± 2,1 <sup>abc</sup>
DKP	26,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	40,6 ± 1,7 <sup>ab</sup>	54,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	66,3 ± 3,8 <sup>bc</sup>
TSP	36,8 ± 4,5 <sup>a</sup>	61,7 ± 3,9 <sup>c</sup>	76,7 ± 1,5 <sup>c</sup>	91,1 ± 12,6 <sup>a</sup>
TKP	32,4 ± 15,3 <sup>a</sup>	56,9 ± 11,1 <sup>bc</sup>	70,6 ± 5,5 <sup>c</sup>	81,4 ± 4,2 <sup>ab</sup>
TSC	20,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	33,7 ± 5,4 <sup>a</sup>	38,9 ± 4,5 <sup>d</sup>	52,3 ± 6,9 <sup>c</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra, em diferentes sais, não diferiram significativamente entre si no teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*\*Fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP), fosfato tripotássico (TKP), citrato trissódico (TSC).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

### 9.3 TEMPO DE COAGULAÇÃO PELO CALOR (HCT)

Na Tabela 9 estão dispostos os valores de HCT das amostras sem e com tratamento térmico, respectivamente. A troca do íon sódio pelo potássio também não altera de forma significativa a estabilidade térmica. Isso acontece na ausência e na presença de tratamento térmico e nos dois pares de sais comparados (DSP/DKP e TSP/TKP). É possível observar que as amostras com adição de TSP e TKP, nas concentrações a partir de 0,10%, apresentaram HCT igual a 0. Isso significa que essas amostras apresentaram sinais visíveis de coagulação antes de serem submetidas à temperatura de HCT (155°C). Os sais TSP e TKP apresentaram os maiores valores de pH, além de terem a maior capacidade de sequestrar íons cálcio, principalmente nas

concentrações de 0,15 e 0,20%. Nesse sentido, a literatura científica descreve que o HCT é altamente dependente do pH, pois esse parâmetro afeta a carga das proteínas, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  da fase solúvel, além de afetar a quantidade de fosfato de cálcio coloidal (Rose, 1962; Singh, 2004; De Kort et al., 2012).

O HCT das amostras com adição de TSC não apresenta diferença estatística em relação ao par DSP/DKP e ao par TSP/TKP nas amostras de concentração de 0,05%. A partir da concentração de 0,10%, o HCT das amostras com adição de TSC torna-se diferente do par TSP/TKP. Tais situações ocorrem na ausência e presença de tratamento térmico. As variações no HCT podem estar relacionadas às mudanças na quantidade de fosfato de cálcio coloidal, pois ocorre a precipitação de cálcio e fosfato ( $\text{Ca}$  e  $\text{PO}_4$ ) nas micelas de caseína durante o tratamento térmico, o que resulta em um aumento nos níveis de fosfato de cálcio coloidal (Nieuwenhuije; Huppertz, 2022; Ahmadi; Huppertz; Vasiljevic, 2024).

Em contrapartida aos resultados aqui apresentados, De Kort *et al.* (2012) mostra que a adição de DSP e TSC aumenta o HCT em amostras de isolado de caseína micelar. Essa diferença pode estar relacionada à composição proteica, pois a presença de proteínas do soro torna o perfil de HCT diferente das amostras que contém apenas caseína (Singh, 2004). Além disso, as proteínas do soro desnaturam em temperaturas acima de  $70^\circ\text{C}$  e podem alterar a superfície das micelas de caseína, ao formar ligações dissulfeto com a  $\kappa$ -caseína. (Vasbinder; De Kruif, 2003; Dalgleish; Corredig, 2012).

Tabela 9 - HCT (minutos) sem e com tratamento térmico.

<b>HCT (sem tratamento térmico)*</b>					
<b>Sais**</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	24,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	7,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
DKP	24,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	9,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,7 <sup>b</sup>
TSP	24,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
TKP	24,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	11,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
TSC	24,3 ± 3,0 <sup>a</sup>	11,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	9,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
<b>HCT (com tratamento térmico)*</b>					
<b>Sais**</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	12,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,4 <sup>ab</sup>
DKP	12,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	6,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
TSP	12,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	7,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
TKP	12,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
TSC	12,1 ± 1,1 <sup>a</sup>	10,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	8,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	8,0 ± 1,4 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra, em diferentes sais, não diferiram significativamente entre si no teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*\*Fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP), fosfato tripotássico (TKP), citrato trissódico (TSC).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

#### 9.4 CÁLCIO IÔNICO EM pH = 4,0

Na Tabela 10 é apresentada a atividade do íon  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 (mM) das amostras tratadas termicamente. O  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 foi empregado para medir o teor total de cálcio nas amostras, com o objetivo de verificar se a adição de sais sequestrantes nas concentrações propostas afetava o equilíbrio de cálcio em um pH próximo ao ponto isoelétrico das caseínas (pH entre 4,6 e 4,7). A mesma metodologia foi usada por Campos *et al.* (2024).

Observa-se que não há diferença estatística entre as amostras. Portanto, a adição de diferentes sais, inclusive com a troca do íon sódio pelo íon potássio, em diferentes concentrações não acarreta mudanças significativas na atividade do íon  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0. Esse

resultado está de acordo com o que foi relado por Campos *et al.* (2024) para a adição de ortofosfato (monofosfato monossódico) e citrato trissódico em leite desnatado, visto que esses sais acarretaram mudanças pequenas (não significativas) no teor de cálcio (pH = 4,0). Em contrapartida, Pranata *et al.* (2023) registrou um aumento no cálcio total (analisado por plasma indutivamente acoplado) nos sobrenadantes de amostras provenientes de concentrado de caseína micelar e concentrado de proteína do leite adicionadas de DKP a uma concentração de 0,15%.

Tabela 10 - Atividade do íon  $\text{Ca}^{2+}$  em pH = 4,0 (mM) com tratamento térmico.

<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> em pH = 4.0 (com tratamento térmico)*</b>					
<b>Sais**</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	14,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	13,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	11,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	11,1 ± 1,2 <sup>a</sup>
DKP	14,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	11,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,4 <sup>a</sup>
TSP	14,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	13,1 ± 3,0 <sup>a</sup>	12,5 ± 2,8 <sup>a</sup>	12,0 ± 2,8 <sup>a</sup>	11,4 ± 3,0 <sup>a</sup>
TKP	14,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	12,1 ± 1,6 <sup>a</sup>	11,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
TSC	14,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	15,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	14,9 ± 2,3 <sup>a</sup>	14,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	14,5 ± 1,8 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra, em diferentes sais, não diferiram significativamente entre si no teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*\*Fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP), fosfato tripotássico (TKP), citrato trissódico (TSC).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 9.5 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS

Na Tabela 11 é apresentado os valores de Dv90 (diâmetro hidrodinâmico em que 90% das partículas são encontradas) das amostras tratadas termicamente. É possível observar que em alguns casos, o valor do desvio padrão é muito alto. Isso acontece pois quando há presença de coágulos nas amostras, o perfil de distribuição do tamanho de partículas não segue um padrão, apresentando altos valores de desvio padrão, conforme é observado na Tabela 11. Apesar disso, é visível nos resultados da Tabela 11 que a adição do sal DSP e a adição do sal DKP possui valores similares de Dv90. Esse comportamento se torna diferente ao comparar a

adição do sal TSP com a adição do sal TKP a partir da concentração de 0,10%. A adição do sal TKP acarreta mudanças ainda maiores no Dv90 a partir da concentração de 0,10%. Portanto, nesse caso, a troca do íon sódio pelo potássio alterou o perfil de distribuição do tamanho das partículas. Conforme os resultados apresentados anteriormente, não houve mudança de pH e de capacidade sequestrante nas amostras quando o íon sódio é trocado pelo íon potássio, portanto essa diferença observada no Dv90 da amostra adicionada de TKP não foi devido a mudanças dos parâmetros citados.

De acordo com Durdagi, Roux e Noskov (2013), para que uma proteína se ligue de forma favorável a um íon, ela deve compensar a perda de hidratação, ou seja, a proteína deve compensar o custo energético de remover moléculas de água de um íon. O  $K^+$  possui o número de hidratação igual a 10,5, enquanto o número de hidratação do  $Na^+$  é igual a 16,6, segundo Lee (1999), indicando que as ligações entre proteínas podem estar acontecendo de forma mais favorável na presença do íon potássio. Entretanto a preferência de um sítio proteico por um íon específico depende da combinação de diferentes fatores como, por exemplo: composição química do sítio, número de ligantes coordenados e configuração dos resíduos em torno desse sítio proteico (Durdagi; Roux; Noskov, 2013).

Dubina *et al.* (2013) mostra, através de evidências experimentais e teóricas, que o  $K^+$  é mais eficaz na oligomerização do ácido L-glutâmico em soluções aquosas se comparado ao  $Na^+$ . O trabalho de Jockusch, Lemoff e Williams (2001) citado por Dubina *et al.* (2013) comenta que o íon sódio está coordenado aos átomos de nitrogênio e oxigênio carbonílico dos aminoácidos (coordenação NO), já o íon potássio está coordenado aos átomos de oxigênio (coordenação OO), que apresenta menor energia de ligação. Baseado nessa informação, Dubina *et al.* (2013) sugere que a coordenação NO diminui a reatividade dos aminoácidos, pois a ligação peptídica se inicia a partir de um ataque nucleofílico no par de elétrons isolados do átomo de nitrogênio, mostrando que a formação de peptídeos mediada por  $Na^+$  é mais fraca.

Portanto, os resultados apresentados associados aos indícios da literatura científica mostram que o íon potássio pode estar se ligando às proteínas de forma mais eficiente se comparado ao íon sódio e formando aglomerados proteicos que causam as alterações observadas na distribuição do tamanho das partículas (Dv90) das amostras adicionadas de TKP.

Tabela 11 - Diâmetro hidrodinâmico em que 90% das partículas são encontradas (Dv90) com tratamento térmico.

<b>Dv90 (com tratamento térmico)*</b>					
<b>Sais**</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,05%</b>	<b>0,10%</b>	<b>0,15%</b>	<b>0,20%</b>
DSP	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>
DKP	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a</sup>
TSP	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,89 ± 1,89 <sup>a</sup>	73,26 ± 71,90 <sup>ab</sup>
TKP	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	466,95 ± 363,95 <sup>c</sup>	120,97 ± 139,25 <sup>ab</sup>	170,40 ± 97,87 <sup>b</sup>
TSC	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra não diferiram significativamente entre si no teste de Tukey (p>0,05).

\*\*Fosfato dissódico (DSP), fosfato dipotássico (DKP), fosfato trissódico (TSP), fosfato tripotássico (TKP), citrato trissódico (TSC).

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

## 10 CONSIDERAÇÕES

Diante do exposto, é possível concluir que a troca do íon sódio pelo íon potássio não alterou de forma significativa os parâmetros de pH, capacidade sequestrante, tempo de coagulação pelo calor e teor de  $\text{Ca}^{2+}$  em  $\text{pH} = 4,0$ . Entretanto, foi observada uma mudança no perfil de distribuição do tamanho das partículas com a adição do fosfato tripotássico (TKP) a partir da concentração de  $0,10\% \text{ m.m}^{-1}$ . Portanto a troca do íon sódio pelo íon potássio alterou o  $Dv_{90}$  (diâmetro hidrodinâmico em que 90% das partículas são encontradas), indicando que o íon potássio pode estar se ligando às proteínas de forma mais eficiente se comparado ao íon sódio.

É possível concluir também que as principais mudanças na estrutura coloidal do leite desnatado foram causadas pela adição dos sais fosfato trissódico (TSP) e fosfato tripotássico (TKP), principalmente nas concentrações acima de  $0,10\% \text{ m.m}^{-1}$ , visto que esses sais registraram os maiores valores de pH e capacidade sequestrante quando comparado aos demais sais, além de apresentarem tempo de coagulação pelo calor igual a zero e alterações no perfil de distribuição do tamanho das partículas.

## 11 CONCLUSÃO

Essa tese de doutorado, em geral, teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes sais sequestrantes de cálcio nas propriedades físico-químicas e na estrutura coloidal do leite desnatado. O primeiro capítulo abordou o uso dos quatro sais sequestrantes de cálcio permitidos pela legislação brasileira e outros dois sais não permitidos, enquanto o segundo capítulo trouxe a comparação entre sais sequestrantes de cálcio compostos por diferentes cátions ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ). Os resultados obtidos fornecem informações valiosas para a indústria de laticínios, especialmente no contexto da regulamentação brasileira acerca do uso de sais sequestrantes de cálcio em produtos lácteos.

No primeiro capítulo, os experimentos demonstraram que os sais sequestrantes de cálcio, em particular o difosfato tetrassódico (TSDP) e o trifosfato de sódio (STP), nas concentrações de 0,15% e 0,20% ( $\text{m.m}^{-1}$ ), foram os que provocaram as alterações mais significativas no sistema coloidal do leite desnatado. Esses compostos aumentaram consideravelmente o pH, demonstraram elevada capacidade de sequestro de cálcio e reduziram o tempo de coagulação térmica (HCT). Além disso, influenciaram o equilíbrio do cálcio em pH 4,0 e modificaram a distribuição do tamanho das partículas.

O segundo capítulo mostrou que foi a substituição do íon sódio pelo íon potássio nos sais sequestrantes não alterou significativamente parâmetros importantes como pH, capacidade de sequestro de cálcio, HCT e teor de  $\text{Ca}^{2+}$  em pH 4,0. Entretanto, observou-se que o fosfato tripotássico (TKP), em concentrações a partir de 0,10% ( $\text{m.m}^{-1}$ ), provocou alterações no perfil de distribuição de partículas ( $D_{v90}$ ), sugerindo que o íon potássio pode interagir de forma mais efetiva com as proteínas do leite quando comparado ao íon sódio.

Como perspectivas para trabalhos futuros, sugere-se a realização de estudos que avaliem os efeitos sensoriais decorrentes da substituição do íon sódio pelo íon potássio em sais sequestrantes. Além disso, seria interessante investigar o comportamento dos sais sequestrantes de cálcio em diferentes condições de processamento térmico e em formulações lácteas mais complexas, como as formulações de alta proteína.

Em síntese, os resultados deste trabalho avançam o conhecimento científico sobre os efeitos dos sais sequestrantes de cálcio em leite desnatado e fornecem informações relevantes para a indústria de laticínios. A compreensão detalhada das mudanças na estrutura coloidal do leite desnatado permite otimizar a seleção de aditivos, contribuindo para o desenvolvimento de produtos com melhor estabilidade térmica, maior vida de prateleira e composição nutricional mais adequada às demandas atuais do mercado.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, E.; HUPPERTZ, T.; VASILJEVIC, T. Heat stability of skim milk containing various levels of micellar calcium phosphate. **International Dairy Journal**, v. 153, 105900, 2024.
- ANEMA, S. G. Age gelation, sedimentation, and creaming in UHT milk: a review. *Comprehensive Reviews*. **Food Science and Food Safety**, 18, 140-166, 2019.
- ANEMA, S. G. Heat-induced changes in caseins and casein micelles, including interactions with denatured whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 122, 105136, 2021.
- ANEMA, S. G.; KLOSTERMAYER, H.  $\zeta$ -potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120 °C. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 673-687, 1996.
- AOKI, T.; TOYOOKA, K.; KAKO, Y. Role of phosphate groups in the calcium sensitivity of  $\alpha$ s2-casein. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1624-1629, 1985.
- BAULAND, J.; GAUCHERON, F.; CROGUENEC, T. Milk Salt Composition, Distribution and Analysis. In: MCSWEENEY, P. L. H.; MCNAMARA, J. P. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2022. p. 941-953.
- BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n. 783, de 4 de abril de 2025**. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 75, de 8 de outubro de 2020**. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 out. 2020. Seção 1, p. 112.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 211, de 1º de março de 2023**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1º mar. 2023.
- BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 429, de 8 de outubro de 2020**. Dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 9 out. 2020. Seção 1, p. 126.
- CAMPOS, N. D. S. et al. Influence of different calcium-chelating salts on the colloidal structure of skimmed milk under simulated heat treatment conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 0, p. 1-11, 2024.
- CANO-SARMIENTO, C.; TÉLLEZ-MEDINA, D. I.; VIVEROS-CONTRERAS, R.; CORNEJO-MAZÓN, M.; FIGUEROA-HERNÁNDEZ, C. Y.; GARCÍA-ARMENTA, E.; ALAMILLA-BELTRÁN, L.; GARCÍA, H. S.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F. Zeta potential of food matrices. **Food Engineering Reviews**, v. 10, p. 113-138, 2018.
- DALGLEISH, D. G.; CORREDIG, M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 449-467, 2012.

DALGLEISH, D. G.; PARKER, T. G. Binding of calcium ions to bovine  $\alpha$ sl-casein and precipitability of the protein-calcium ion complexes. **The Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 1, p. 113-122, 1980.

DALGLEISH, D. G.; SPAGNUOLO, P. A.; GOFF, H. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1025-1031, 2004.

DAVIES, D. T.; WHITE, J. C. D. The stability of milk protein to heat: I. Subjective measurement of heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, 33, p. 67-81, 1966.

DA SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Thermal stability of milk. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, p. 157-163, 1998.

DA SILVA, P. H. F. **UHT milk: determining factors for sedimentation and gelation**. Thesis (Doctorate in Food Sciences). Federal University of Lavras, Lavras, 2003. 163 p.

DE KORT, E. J. P. **Influence of calcium chelators on concentrated micellar casein solutions: from micellar structure to viscosity and heat stability**. 2012. 153 p. Thesis (Doctorate) – Wageningen University, Wageningen.

DE KORT, E.; MINOR, M.; SNOEREN, T.; VAN HOOIJDONK, T.; VAN DER LINDEN, E. Calcium-binding capacity of organic and inorganic ortho- and polyphosphates. **Dairy Science & Technology**, v. 89, p. 283-299, 2009.

DE KORT, E.; MINOR, M.; SNOEREN, T.; VAN HOOIJDONK, T.; VAN DER LINDEN, E. Effect of calcium chelators on heat coagulation and heat-induced changes of concentrated micellar casein solutions: The role of calcium-ion activity and micellar integrity. **International Dairy Journal**, v. 26, p. 112-119, 2012.

DE KORT, E.; MINOR, M.; SNOEREN, T.; VAN HOOIJDONK, T.; VAN DER LINDEN, E. Effect of calcium chelators on physical changes in casein micelles in concentrated micellar casein solutions. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 907-913, 2011.

DESHWAL, G. K.; FENELON, M.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; HUPPERTZ, T. Influence of citrate- and phosphate-based calcium sequestering salts on the disruption of casein micelles. **Food Hydrocolloids**, v. 153, 109970, 2024.

DESHWAL, G. K.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; FENELON, M.; HUPPERTZ, T. A review on the effect of calcium sequestering salts on casein micelles: from model milk protein systems to processed cheese. **Molecules**, v. 28, 2085, 2023.

DUBINA, M. V. et al. Potassium ions are more effective than sodium ions in salt induced peptide formation. **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 43, p. 109-117, 2013.

DUMPLER, J.; KULOZIK, U. Heat stability of concentrated skim milk as a function of heating time and temperature on a laboratory scale - Improved methodology and kinetic relationship. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 111-117, 2015.

DURDAGI, S.; ROUX, B.; NOSKOV, S. Y. Potassium-Binding Site Types in Proteins. In: KRETSINGER, R. H.; UVERSKY, V. N.; PERMYAKOV, E. A. (eds.). **Encyclopedia of Metalloproteins**. New York: Springer, 2013.

Embrapa Gado de Leite; **Anuário Leite 2023: Leite baixo carbono**; EMBRAPA; Juiz de Fora, 2023. [<https://www.embrapa.br/gado-de-leite/busca-depublicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>] Acesso em Setembro 2024.

FOX, P. F.; HOYNES, M. C. T. Heat stability of milk: influence of colloidal calcium phosphate and  $\beta$ -lactoglobulin. **Journal of Dairy Research**, 42, 427-435, 1975.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects**. 4<sup>a</sup> ed. Springer, 2013.

GAO, R.; VAN HALSEMA, F. E. D.; TEMMINGHOFF, E. J. M.; VAN LEEUWEN, H. P.; VAN VALENBERG, H. J. F.; EISNER, M. D.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Modelling ion composition in simulated milk ultrafiltrate (SMUF) II. Influence of pH, ionic strength and polyphosphates. **Food Chemistry**, v. 122, p. 710-715, 2010.

GARCIA, A.; ALTING, A.; HUPPERTZ, T. Effect of sodium hexametaphosphate on heat-induced changes in micellar casein isolate solutions. **International Dairy Journal**, v. 140, 105583, 2023a.

GARCIA, A.; ALTING, A.; HUPPERTZ, T. Disruption of casein micelles by calcium sequestering salts: From observations to mechanistic insights. **International Dairy Journal**, v. 142, 105638, 2023b.

GAUCHER, I.; MOLLÉ, D.; GAGNAIRE, V.; GAUCHERON, F. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 130-143, 2008.

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

GAUCHERON, F. Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 400S-409S, 2011.

GEERTS J. P.; BEKHOF, J. J.; SCHERJON, J. W. Determination of calcium ion activities in milk with an ion selective electrode. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.37, p. 197–211, 1983.

GUO, C.; CAMPBELL, B. E.; CHEN, K.; LENHOFF, A. M.; VELEV, O. D. Casein precipitation equilibria in the presence of calcium ions and phosphates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 29, 297-307, 2003.

HOLLAND, J. W.; BOLAND, M. J. Post-translational modifications of caseins. In: BOLAND, M.; SINGH, H.; THOMPSON, A. (Ed.). **Milk proteins**. 2. ed. London: Elsevier, 2014. p. 141-168.

HORNE, D. S. A balanced view of casein interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 28, p. 74-86, 2017.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v. 33, p. 421-434, 2004.

HOLT, C. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. **International Dairy Journal**, 60, 2-13, 2016.

HOLT, C. Effect of heating and cooling on the milk salts and their interaction with casein. In: Fox PF (Ed), **Heat induced changes in milk**. International Dairy Federation, No 9501, Bruxelles, p. 105-133, 1995.

HOLT, C.; DALGLEISH, D. G.; JENNESS, R. Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. **Analytical Biochemistry**, v. 113, p. 154-163, 1981.

HOYT, H. M.; PRANATA, J.; BARBANO, D. M.; DRAKE, M. Effect of dipotassium phosphate and heat on milk protein beverage viscosity and color. **Journal of Dairy Science**, v. 106, p. 3884-3899, 2022.

HUPPERTZ, T. Chemistry of the caseins. In: MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. 4th ed. Vol. 1A. Boston: Springer US, 2013. p. 135-160.

HUPPERTZ, T. Heat stability of milk. In: **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition**. [s.l.], pp. 179-196. Springer New York, 2016.

JAVED, H. et al. Comparison of extraction methods and nutritional benefits of proteins of milk and dairy products: a review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 40, p. 331-344, 2022.

JOCKUSCH, R. A.; LEMOFF, A. S.; WILLIAMS, E. R. Effect of metal ion and water coordination on the structure of a gas-phase amino acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 12255-12265, 2001.

KRUIF, C. G.; HOLT, C. **Casein micelle structure, functions and interactions**. In: McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. 3. ed. Vol. 1: Proteins. Boston: Springer US, 2003. p. 233-276. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_5).

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. Tradução da 5ª ed. inglesa: HENRIQUE E. TOMA; KOITI ARAKI; REGINALDO C. ROCHA. São Paulo: Blucher, 1999.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n.1, 2011.

MAURER-ROTHMANN, A.; SCHEURER, G. **Stabilization of Milk Protein Systems: A JOHA Guide**. BK Giulini GmbH, Germany, 2005.

- MCINTYRE, I.; O'SULLIVAN, M.; O'RIORDAN, D. Effects of calcium chelators on calcium distribution and protein solubility in rennet casein dispersions. **Food Chemistry**, v. 197, p. 233-239, 2016.
- MEJARES, C. T.; CHANDRAPALA, J.; HUPPERTZ, T. Influence of calcium-sequestering salts on heat-induced changes in blends of skimmed buffalo and bovine milk. **Foods**, v. 12, 2260, 2023.
- MEJARES, C. T.; HUPPERTZ, T.; CHANDRAPALA, J. Effect of calcium-sequestering salts and heat treatment on the rheological and textural properties of acid gels from blends of skimmed buffalo and bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 149, 105840, 2024.
- MEKMENE, O.; LE GRAET, Y.; GAUCHERON, F. Theoretical model for calculating ionic equilibria in milk as a function of pH: Comparison to experiment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4440-4447, 2010.
- MULLAN, W. M. A. **Calculator for determining the lethality and chemical changes in UHT-heated products using the trapezoid and Simpson's rules**. [S.l.]: Dairy Science Info. Disponível em: <https://www.dairyscience.info/uht-t/>. Acesso em: 11 nov. 2024.
- NELSON, L.S.; HOLT, C.; HUCKINS, D.W.L. The EXAFS spectra of poorly crystalline calcium fosfate preparations from heated milk. **Physica B**, 158, p. 103-104, 1989.
- NIEUWENHUIJE, H.; HUPPERTZ, T. Heat-induced changes in milk salts: a review. **International Dairy Journal**, v. 126, 105220, 2022.
- O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effect of casein micelle size. **Journal of Dairy Science**, 83, 378-386, 2000.
- ONWULATA, C. I. (Ed.). **Whey processing, functionality and health benefits**. Ames: Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2009.
- ORDOÑEZ, J. A. et. al. **Tecnología de Alimentos: componentes dos alimentos e processos**. V. 1. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- OUANEZAR, M.; GUYOMARC'H, F.; BOUCHOUX, A. AFM imaging of milk casein micelles: Evidence for structural rearrangement upon acidification. **Langmuir**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 4915-4919, 2012.
- PANOUILLE, M.; NICOLAI, T.; DURAND, D. Heat induced aggregation and gelation of casein submicelles. **International Dairy Journal**, 14, 297-303, 2004.
- PETIT, J.; HERBIG, A.-L.; MOREAU, A.; DELAPLACE, G. Influence of calcium on  $\beta$ -lactoglobulin denaturation kinetics: implications in unfolding and aggregation mechanisms. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5794-5810, 2011.
- PITKOWSKI, A.; NICOLAI, T.; DURAND, D. Scattering and turbidity study of dissociation of casein by calcium chelation. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 369-375, 2008.

POPPI, F. A.; COSTA, M. de R.; DE RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI, K. Soro de leite e suas proteínas: composição e atividade funcional. **Journal of Health Sciences**, [S. l.], v. 12, n. 2, 6 jul. 2015. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/1355>. Acesso em: 27 abr. 2025.

PRANATA, J.; HOYT, H.; DRAKE, M.; BARBANO, D. M. Effect of dipotassium phosphate addition and heat on proteins and minerals in milk protein beverages. **Journal of Dairy Science**, v. 107, p. 695-710, 2023.

RENHE, I. R. T.; INDRIS, L. M.; CORREDIG, M. Effect of calcium chelators on heat stability and heat-induced changes of milk microfiltered concentrates. **International Dairy Journal**, v. 82, p. 4-10, 2018.

ROSE, D. Factors affecting the heat stability of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 1305-1311, 1962.

SILVA, N. N.; CASANOVA, F.; PINTO, M. S.; CARVALHO, A. F.; GAUCHERON, F. Micelas de caseína: dos monômeros à estrutura supramolecular. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, e2018185, 2019.

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

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

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins—From "gutter-to-gold". **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008.

SOUSA, H. M. S. **Influência da temperatura na agregação e desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina**. 2019. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2019.

SWAISGOOD, H. E. **Chemistry of the caseins**. In: McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. (Ed.). *Advanced dairy chemistry*. 3. ed. Vol. 1A. Boston: Springer US, 2003. p. 139-201. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_3).

TAVARES, G. M. Proteínas do soro de leite: aspectos físico-químicos e estruturais. In: DE CARVALHO, A. F.; PERRONE, I. T.; STEPHANI, R.; TAVARES, G. M.; RENHE, I. R. T. (org.). **Química e tecnologia do soro de leite**. 1. ed. Juiz de Fora: Innóvite, 2020. p. 19–29.

TSIOULPAS, A.; KOLIANDRIS, A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Effects of stabilizer addition and in-container sterilization on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1027-1034, 2010.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of minerals on casein micelle stability. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 167-173, 2007.

UDABAGE, P.; MCKINNON, I. R.; AUGUSTIN, M. Mineral and casein equilibria in milk: effects of added salts and calcium-chelating agents. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 361-370, 2000.

VAN WAZER, J. R. Chemistry of the phosphates and condensed phosphates. In: DEMAN, J. M.; MELNYCHYN, P. (Eds.). **Symposium: Phosphates in Food Processing**. Westport, CT: AVI Publishing, 1971.

VASBINDER, A. J.; DE KRUIF, C. G. Casein-whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 669-677, 2003.

VISSER, J.; MINIHAN, A.; SMITS, P.; TJAN, S.B.; HEERTJE, I. Effects of pH and temperature on the milk salt system. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 40, p. 351-368, 1986.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Second Edition, Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006.

WOLFSCHOON POMBO, A. F.; BÖTTGER, D.; LÖSCHE, K. Pufferkapazität mikrofiltrierter Magermilchkonzentrate. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 84, p. 465-474, 2012.