

MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRA DE REQUEIJÃO CREMOSO PARA AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (SEM)

Darlila Aparecida GALLINA¹; Ariene Gimenes Fernandes VAN DENDER²

Method for the preparation of samples of Requeijão cremoso for Scanning Electron Microscopy analysis (SEM).

1. RESUMO

Microscopia é um dos procedimentos de análises físico-químicas e mostra a distribuição espacial de componentes corpusculares e a estrutura global de ingredientes e produtos. A microscopia eletrônica tem sido usada para estudar a microestrutura dos componentes individuais de produtos lácteos como micelas de caseína e glóbulos de gordura, e mudanças nestes componentes sozinhos ou por interação com ingredientes durante o processo de fabricação. Este trabalho apresenta uma metodologia de preparo de amostra desenvolvida e adaptada para requeijão cremoso a partir de metodologias utilizadas para queijo processado, com o objetivo de avaliar a microestrutura do referido produto pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). Os resultados obtidos para uma amostra de requeijão cremoso avaliada sugerem que o método proposto neste trabalho pode ser empregado no preparo de amostra deste tipo de produto, para posterior exame e avaliação pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

Palavras-chaves: microscopia eletrônica; método de preparo de amostra; requeijão cremoso; microestrutura; microscopia eletrônica de varredura.

¹Estudante de pós-graduação – Doutorado. Universidade Estadual de Campinas - Departamento de Tecnologia de Alimentos- FEA-UNICAMP. darlila@ital.sp.gov.br

² Instituto de Tecnologia de Alimentos- Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios- TECNOLAT, Av. Brasil nº 2880, Campinas-SP. adender@ital.org.br

2. INTRODUÇÃO

Microscopia é um dos procedimentos de análises físico-químicas e mostra a distribuição espacial de componentes corpusculares e a estrutura global de ingredientes e produtos. A microscopia eletrônica estende a resolução a diversos nanômetros ($1\text{nm} = 1 \times 10^{-9}\text{m}$). Devido ao alto custo do microscópio e dos equipamentos auxiliares, o microscópio eletrônico ainda não é usado em análises de rotina na indústria de alimentos, sendo usado em pesquisas e desenvolvimentos, contribuindo para caracterização estrutural do material sob estudo e para correlacionar a estrutura e as propriedades físicas dos alimentos (KALAB, 1993).

Na técnica conhecida como Microscopia Eletrônica de Varredura ou SEM (sigla em inglês para "*Scanning Electron Microscopy*"), um feixe de elétrons muito fino é focalizado na superfície da amostra. Alguns destes elétrons são refletidos e outros podem originar elétrons de muito baixa energia (secundários) a partir da camada de ouro que reveste a amostra. Estes elétrons secundários de baixa energia produzem uma imagem que é observada em um monitor e fotografada usando uma câmera acoplada, de acordo com o esquema mostrado na Figura 1 (KALAB, 2000). A técnica SEM mostra a superfície da amostra, e é utilizada para visualizar em detalhes objetos tridimensionais, como por exemplo, a rede de proteínas em queijos.

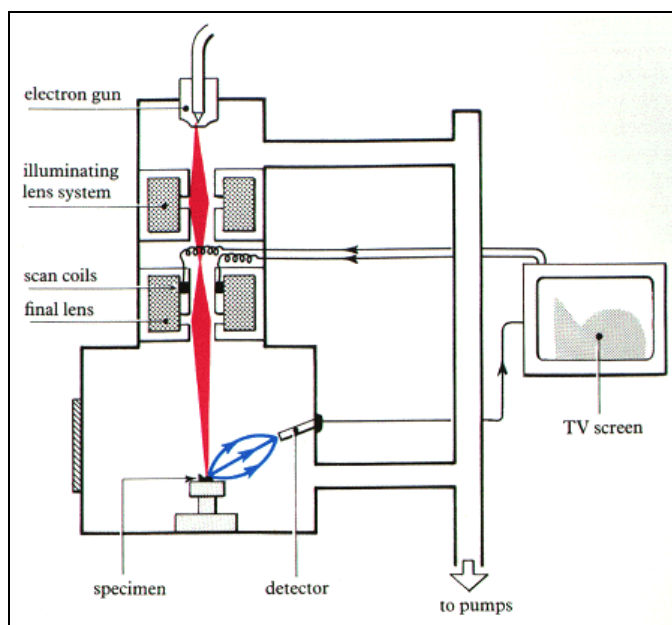


Figura 1. Esquema do funcionamento do sistema do Microscópio Eletrônico de Varredura – SEM (KALAB, 2000).

Em geral, produtos lácteos podem ser divididos em dois grupos com relação à sua composição: um consiste principalmente de proteínas do leite, que são caseínas e soro-proteínas e o outro de gordura. Em sua maioria, os queijos são compostos de ambos, proteínas e gordura, e por isso requerem procedimentos especiais dependendo do objeto de interesse. Quando a microestrutura de produtos lácteos é estudada por microscopia eletrônica, a composição do produto é levada em consideração antes da técnica adequada ser selecionada.

Microscopia eletrônica tem sido usada para estudar a microestrutura dos componentes individuais de produtos lácteos, como micelas de caseína e glóbulos de gordura, e mudanças nestes componentes sozinhos ou por interação com ingredientes durante o processo de fabricação. Micelas de caseína são agregadas no leite durante a produção de queijos e glóbulos de gordura são aprisionados no coágulo. No estudo de microscopia por SEM é necessário remover a gordura da amostra. No preparo da amostra o queijo é fixado em solução de glutaraldeído, pós-fixado com OsO_4 , desidratado em uma série alcoólica, desengordurado com clorofórmio e seco em ponto crítico (COHEN, et al., 1981).

Na metodologia SEM o glutaraldeído é o fixador mais comumente usado, porém fixa somente as proteínas. As concentrações usadas variam dentro de uma ampla faixa, assim como a duração da fixação. Lipídios insaturados em alimentos podem ser fixados usando tetróxido de ósmio após a fixação com glutaraldeído. O tetróxido de ósmio reage com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, levando à formação de um diol e trióxido de ósmio, sendo que o ósmio é facilmente removido por hidrólise. A fixação com glutaraldeído e pós-fixação com tetróxido de ósmio preservam as membranas dos glóbulos de gordura que são compostas de lipoproteínas. O alto teor de gordura ou a presença de glóbulos de gordura muito grandes em produtos lácteos pode causar dificuldades durante o fraturamento da amostra. A gordura (lipídios) é parcialmente fixada durante a pós-fixação com tetróxido de ósmio. A falta de um fixador de gordura, ou seja, a não pós-fixação com tetróxido de ósmio pode levar à presença de resíduos de gordura na amostra na forma de minúsculos glóbulos (KALAB, 2000).

Produtos com alto teor de gordura como queijos, preparados para serem analisadas pela técnica SEM na forma seca, são geralmente desengordurados, pois a gordura presente na amostra pode causar várias dificuldades, como por exemplo escurecer a matriz protéica. A gordura pode ser extraída com acetona durante a desidratação da amostra, com uma mistura de éter de petróleo e éter etílico ou com clorofórmio. No caso de se utilizar o clorofórmio, após a desidratação o mesmo deve ser substituído por álcool, acetona ou acetato, os

quais por serem miscíveis em CO₂ líquido facilitam a secagem posterior da amostra. A amostra é desidratada em uma série alcoólica gradual, desengordurada em solvente (acetona) e seca em ponto crítico em CO₂. Como a secagem pode alterar a microestrutura original do produto, a rede protéica deve ser primeiramente fixada (COHEN, et al., 1981).

A secagem em ponto crítico, ou do termo em inglês Critical-Point Drying (CPD) é uma técnica apropriada para secagem da maioria dos produtos lácteos que tenham sido previamente fixados e desidratados em série gradual com etanol ou acetona. Esta técnica é baseada na conversão do CO₂ líquido, no qual a amostra desidratada é imersa em um sistema fechado e com o qual é gradualmente impregnada, para forma gasosa pelo aumento da temperatura acima do ponto crítico. Acima desta temperatura o CO₂ existe somente como um gás. A CPD é conveniente para a maioria dos produtos lácteos compostos principalmente por proteína e não deve ser usada em produtos que contenham amidos gelatinizados. A gordura também pode ser afetada durante a CPD devido ao fato do solvente orgânico e do CO₂ líquido apresentarem propriedades lipofílicas, portanto é necessário desengordurar a amostra de produtos com alto teor de gordura antes de se efetuar a secagem em ponto crítico (COHEN, et al., 1981).

As amostras secas são fraturadas antes de serem montadas em “stubs” de alumínio para SEM (Figura 2a). A fratura é feita manualmente com o auxílio de um microscópio de baixo aumento dotado de um foco de luz para facilitar a operação. Uma lâmina é comprimida na borda da amostra e esta é quebrada, ou, alternativamente, a amostra pode ser rompida pressionando-se as extremidades com o auxílio de duas pinças. Os fragmentos da amostra são, a seguir, montados em “stubs” para SEM utilizando-se um cimento condutivo de prata coloidal; também foi relatado o uso de outros agentes para colagem, como brilho para unhas (esmalte) misturado com carbono (grafite). A importância de se usar o cimento de prata com uma consistência apropriada se deve ao fato de que um cimento fino ou fraco demais pode penetrar no fragmento seco e este se romper, ao passo que um cimento grosso ou denso demais pode não colar ou fixar o fragmento ao “stub” com segurança ou firmeza suficiente para proporcionar uma superfície condutora contínua. Para examinar a amostra pela técnica SEM, a mesma deve ser eletricamente condutora. Substâncias biológicas em geral apresentam dois problemas na aplicação da técnica SEM: a água deve ser removida sem destruir a estrutura e a amostra deve ser condutível. Porém, como material biológico não é condutível, isto pode ser conseguido por procedimentos químicos no qual a amostra é impregnada com ósmio ou, mais freqüentemente,

por revestimento físico com ouro (Figura 2b), ouro-paládio, platina, ou irídio; geralmente ambos os procedimentos são combinados (COHEN, et al., 1981).



Figura 2. “Stubs” de alumínio (a) e Amostra colada nos “stubs” e revestida com ouro (b).

Os fragmentos da amostra podem ser revestidos com ouro em altas pressões (13 a 133 mPa ou 10^{-4} a 10^{-3} Torr), o que permite que os átomos de ouro colidam com moléculas de nitrogênio e se depositem na amostra em várias direções. O revestimento da amostra com ouro (metalização) é feito à temperatura ambiente em evaporador a vácuo, com argônio. Devido à fina microestrutura dos produtos lácteos, para se obter a resolução necessária para aplicar a técnica SEM deve-se usar uma voltagem de 5 a 20 kv (COHEN, et al., 1981).

Diversos autores descreveram métodos de preparação de amostra de queijo processado para observação da microestrutura pela técnica SEM, com destaque para RAYAN, 1980 (apud COHEN, et al., 1981) e MARCHESSEAU et al. (1997).

A metodologia utilizada por RAYAN, 1980 (apud COHEN, et al., 1981) para preparar as amostras de queijo processado constou das seguintes etapas: as amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 1,4%, desidratadas em uma série alcoólica, desengorduradas em clorofórmio e secas em ponto crítico com CO_2 . As amostras secas foram então fraturadas e os fragmentos foram montados em “stubs”, revestidos com carbono e ouro por evaporação sob vácuo e examinados em microscópio eletrônico operado em 20 kv para observar a microestrutura do referido queijo. Por outro lado, a metodologia de preparo da amostra de queijo processado utilizada por MARCHESSEAU et al. (1997) difere da anterior em algumas etapas e obedece ao seguinte protocolo: as amostras foram cortadas em pequenos blocos e fixadas por 2 horas a 20°C em solução de glutaraldeído 2,0% e tamponadas com tampão fosfato 0,05M no valor de pH do queijo. A seguir, as amostras foram desidratadas em triplicata por 15 minutos, com

uma série de etanol (25, 50, 70, 80, 95 e 100%), desengorduradas em clorofórmio, retornando ao etanol e secando em ponto crítico com CO₂. Após a secagem as amostras foram fraturadas e cimentadas em “stubs” de alumínio com cola de prata, revestidas com ouro e finalmente examinadas por SEM operando em 15 kv.

O presente trabalho apresenta um método desenvolvido e adaptado para o preparo da amostra de requeijão cremoso a ser avaliado por Microscopia Eletrônica de Varredura – SEM, com base nos métodos utilizados para queijo processado. O requeijão cremoso originou-se de fabricações caseiras visando o aproveitamento do leite coagulado, ou seja, da coalhada obtida por coagulação espontânea do leite devido à acidificação pela flora láctica natural do leite. A nível industrial o requeijão cremoso consiste atualmente em um produto lácteo fabricado a partir de leite desnatado cru ou pasteurizado, com ou sem adição de culturas lácticas, obtido pela fusão de massa fresca, gordura láctea e sais fundentes (FERNANDES, 1981; FERNANDES; MARTINS, 1980; OLIVEIRA, 1986; MUNCK; CAMPOS, 1984). Sua produção aumentou 144,32% entre os anos 1991 e 2000, o que coloca em evidência o grande valor comercial deste produto (ABIQ, 2002).

Entende-se, portanto, a importância de se desenvolver e/ou adaptar novas metodologias de análise para o requeijão cremoso, especialmente métodos que além de permitirem caracterizar o produto permitem também a avaliação do efeito de processos e de ingredientes na microestrutura do mesmo. Sendo assim, neste trabalho pretende-se disponibilizar um método especialmente adaptado para a preparação da amostra de um produto tipicamente brasileiro para posterior avaliação de sua microestrutura pela técnica SEM.

3. MATERIAL E MÉTODOS

ADAPTAÇÃO DE MÉTODO DE PREPARO DA AMOSTRA DE REQUEIJÃO CREMOSO PARA AVALIAÇÃO PELA TÉCNICA SEM – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

O método de preparo das amostras de requeijão cremoso tradicional (copo) para aplicação da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) foi adaptado a partir daquele preconizado para queijos processados, levando-se em conta a composição do produto, principalmente em relação ao teor de gordura e de proteína. Foram utilizadas amostras de requeijão cremoso tradicional contendo entre 18 e 21% de gordura e 10 e 13% de proteínas.

As amostras de requeijão cremoso tradicional foram inseridas em seringa plástica de 3 mL e impulsionadas em solução de glutaraldeído 2,5% de maneira a

formar finos cordões. A seguir foram fixadas durante 5 horas à temperatura ambiente, lavadas com tampão fosfato 0,1 M três vezes durante 30 minutos e então pós-fixadas com tetróxido de ósmio 0,1 M “overnight” (aproximadamente 15 horas). As amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1 M por três vezes durante 30 minutos cada vez, sendo desidratadas em série alcoólica (etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 95%, e etanol 100%) e, em seguida, desidratadas em acetona 100%. As amostras foram embrulhadas em papel óptico, mantidas em acetona 100% e levadas para secagem em ponto crítico com CO₂ no equipamento Critical Point Dryer - modelo CPD 030 (Figura 3a). Posteriormente as amostras secas foram fraturadas com auxílio de microscópio de baixo aumento dotado de foco de luz (Figura 3b) e coladas em “stubs” de alumínio, metalizadas com ouro (40 mA) no aparelho Sputter Coater SCD 050 (Figura 4) por 240 segundos e examinadas em microscópio eletrônico de varredura (SEM) JEOL, Modelo JSM 5800 LV (Figura 5) operando em 10 kv.



Figura 3. Equipamento Critical Point Dryer Modelo CPD 030 utilizado para secagem das amostras em ponto crítico com CO₂ (a) e Microscópio de baixo aumento dotado de foco de luz utilizado para facilitar a operação de fratura das amostras (b).



Figura 4. Equipamento Sputter Coater SCD 050 utilizado para metalização das amostras fraturadas e coladas nos “stubs” de alumínio.



Figura 5. Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL, Modelo JSM 5800 LV utilizado para observação da microestrutura da amostra de requeijão cremoso.

A Figura 6 apresenta as principais etapas do procedimento de preparação das amostras.

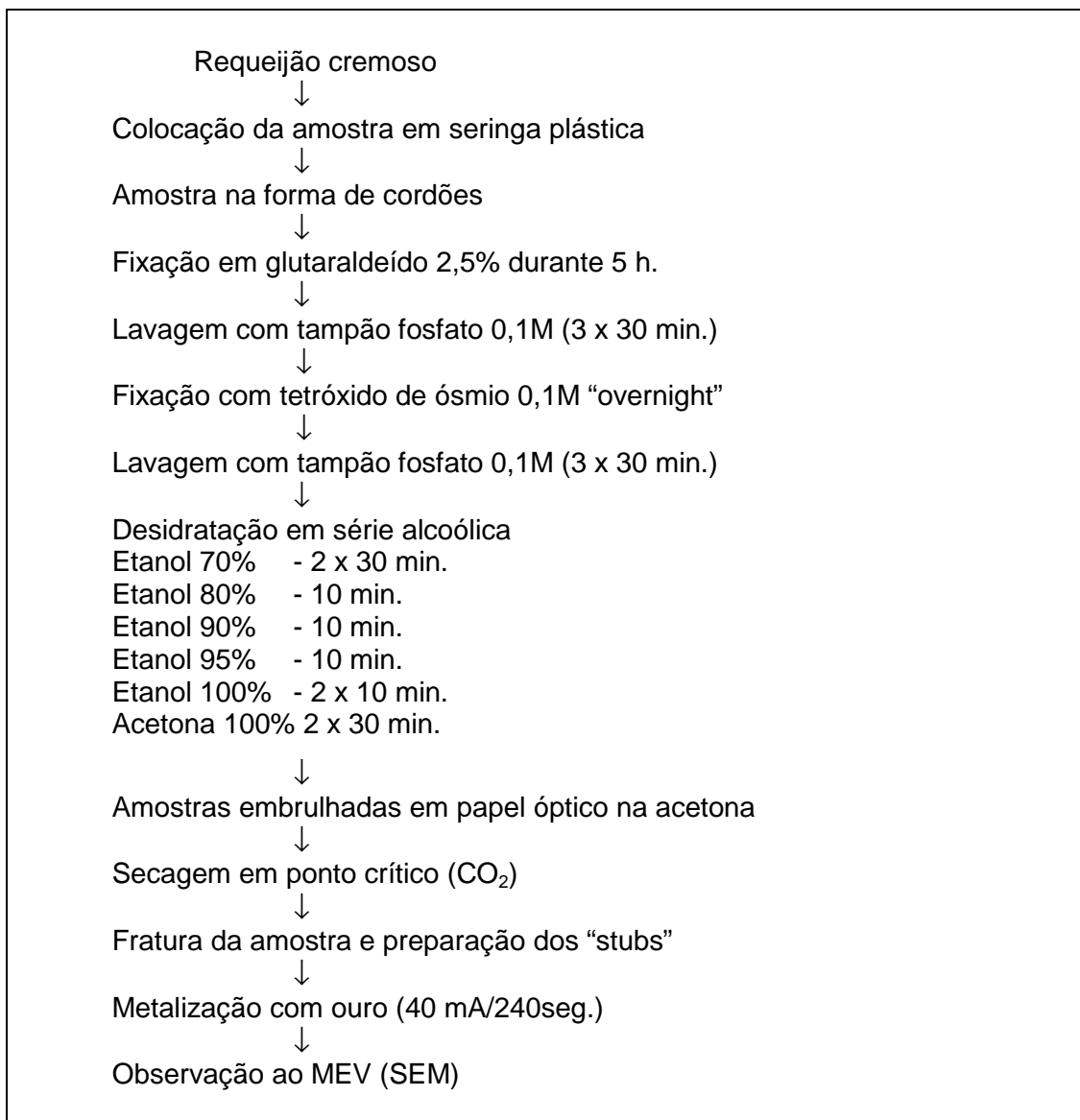


Figura 6. Etapas do preparo das amostras de requeijão cremoso para observação da microestrutura pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à estrutura do requeijão cremoso e à sua viscosidade, é inviável cortar as amostras em pequenos blocos, como foi citado por MARCHESSEAU et al. (1997). Para resolver esta questão optou-se por inserir a amostra no glutaraldeído de forma que os fragmentos obtidos tivessem a espessura adequada, ou seja, não fossem tão grossos que viessem a impossibilitar a devida penetração do glutaraldeído e do ósmio na amostra. Para isso utilizou-se uma seringa plástica de 3 mL obtendo-se então finos cordões da amostra que eram impulsionados na

solução de glutaraldeído de tal forma que a espessura dos mesmos permitiu a adequada fixação e pós-fixação da amostra e a ruptura da amostra para preparação nos “stubs”. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% durante 5 horas de maneira similar ao método de MARCHESSEAU et al. (1997), porém com concentração e tempo ligeiramente superiores, para garantir a fixação adequada.

As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio, o que não foi utilizado nas metodologias de RAYAN, 1980 (apud COHEN, et al., 1981) e MARCHESSEAU et al. (1997). Neste caso optou-se por este procedimento, pois como o requeijão cremoso apresenta elevado teor de gordura, a presença da gordura poderia causar problemas durante o fraturamento da amostra. Como a gordura (lipídios) é parcialmente fixada durante a pós-fixação com tetróxido de ósmio esta etapa evita que a gordura seja totalmente extraída com solventes lipofílicos, como por exemplo a acetona durante o processo de secagem em ponto crítico com CO₂. O tetróxido de ósmio também exerce um papel fundamental, favorecendo a condutividade da amostra, o que possibilita que a mesma seja avaliada pela técnica SEM. O tempo de pós-fixação com tetróxido de ósmio deve ser tal que permita a penetração e impregnação do mesmo no interior da amostra.

O procedimento empregado na desidratação das amostras foi ligeiramente diferente daquele utilizado por MARCHESSEAU et al., 1997 (25, 50, 70, 80, 95 e 100%), utilizando-se uma série alcoólica gradual de etanol (70, 80, 90, 95 e 100%). Após a desidratação RAYAN, 1980 (apud COHEN, et al., 1981) e MARCHESSEAU et al. (1997) utilizaram clorofórmio para desengordurar a amostra antes da secagem em ponto crítico com CO₂. A gordura pode ser extraída com acetona durante a desidratação da amostra, com uma mistura de éter de petróleo e éter etílico ou com clorofórmio. No caso de se utilizar o clorofórmio, o mesmo deve ser substituído por álcool, acetona ou acetato, os quais por serem miscíveis em CO₂ líquido facilitam a secagem posterior da amostra. Portanto, decidiu-se utilizar a acetona para desengordurar a amostra, já que o uso de tal solvente facilita a próxima etapa, ou seja, a secagem em ponto crítico.

Após a secagem, as amostras são fraturadas manualmente e coladas ou cimentadas em pequenos artefatos de alumínio denominados “stubs”. A colagem pode ser feita utilizando cola de prata coloidal, porém devido ao alto custo da cola de prata uma alternativa viável consiste no uso de esmalte incolor contendo carbono (grafite), de forma a garantir a condutividade da amostra.

As amostras são metalizadas por evaporação sob vácuo, ou seja, revestidas com uma fina camada de ouro, proporcionando a condutividade da mesma necessária para sua observação pela técnica SEM.

Devido à fina microestrutura dos produtos lácteos, para obter a resolução necessária ao emprego de SEM deve-se usar uma voltagem de 5 a 20 kv. RAYAN, 1980 (apud COHEN, et al., 1981) observou as amostras de queijo processado em 20 kv e MARCHESSEAU et al. (1997) em 15 kv. Para as amostras de requeijão cremoso avaliadas neste trabalho, a melhor resolução foi conseguida operando o microscópio em 10 kv.

Nas Figuras 7 e 8 observam-se os resultados da aplicação da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) para amostra de requeijão cremoso tradicional (copo) preparada de acordo com o método proposto neste trabalho.

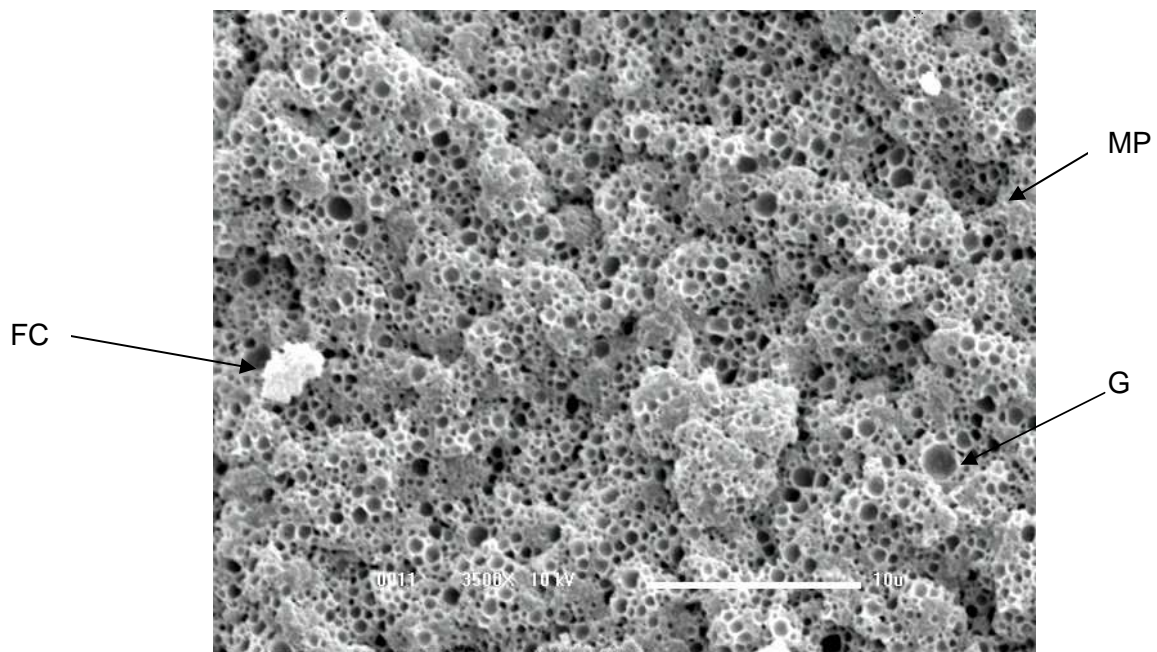


Figura 7. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de Requeijão cremoso tradicional (teor de gordura: 18,29%; teor de proteína total: 10,77%; massa obtida por acidificação direta a quente; tratamento térmico do produto até 90°C). Aumento de 3500 x, 10 kv.

FC = cristais de fosfato de cálcio; MP = Matriz proteica; G = espaço vazio onde se encontrava o glóbulo de gordura.

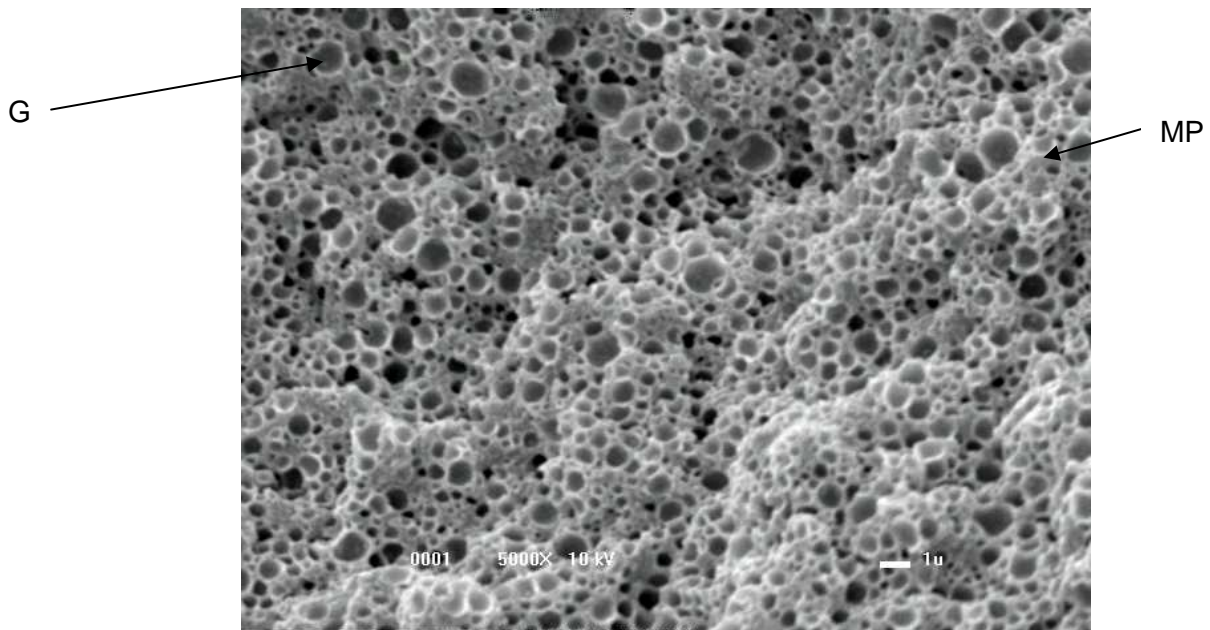


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) de Requeijão cremoso tradicional (teor de gordura: 20,40%; teor de proteína total: 12,52%; massa obtida por acidificação direta a quente; tratamento térmico do produto até 90°C). Aumento de 5000 x, 10 kv.

MP = Matriz protéica; G = espaço vazio onde se encontrava o glóbulo de gordura.

Os espaços vazios na matriz protéica observados nas Figuras 7 e 8 indicam a presença inicial de partículas de gordura e seus agregados nas amostras, as quais foram extraídas durante a preparação das mesmas para a observação pela técnica SEM (TAMIME et al. 1990). A matriz protéica é visível com espaços abertos de várias formas e tamanhos, representando os glóbulos de gordura. Quanto maior o conteúdo de gordura, maior o número de espaços vazios. Um grande número de glóbulos de gordura é eventualmente distribuído dentro da matriz protéica com tamanhos e formas variáveis, produzindo uma estrutura como “esponja” (MISTRY; ANDERSON, 1993). Segundo ADHIKARI (1993), numerosos pequenos “vazios” foram encontrados ao longo da matriz dos produtos avaliados em seu trabalho pela técnica SEM (Khoa e Gulabjamun), produzindo uma típica estrutura de “favo de mel”. Estrutura semelhante pode ser observada no requeijão cremoso tradicional (copo) apresentado nas Figuras 7 e 8.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o método de preparo de amostra adaptado para requeijão cremoso é adequado para observação posterior do produto em Microscópio Eletrônico de Varredura, sugerindo-se, portanto, o seu uso em análises microscópicas para avaliar a microestrutura de referido produto pela técnica SEM.

6. SUMMARY

Microscopy is one of the most useful physical-chemical analysis techniques that shows the spatial distribution of corpuscular components and the global structure of ingredients and products. Electronic microscopy has been extensively used to study the microstructure of individual components of dairy products, such as casein micelles and fat globules and to investigate changes affecting these components either alone or by interaction with other ingredients or substances during the manufacturing process. This study describes a sample preparation technique for Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis originally developed for studying the microstructure of processed cheese and especially adapted for *requeijão cremoso*. The results obtained with the use of this preparation technique with a sample of *requeijão cremoso* suggest that the method proposed in this paper may be used in microscopic analysis (SEM) to examine and evaluate the microstructure of this kind of product.

7. BIBLIOGRAFIA

ADHIKARI, A. K. Microstructure and texture of Khoa and Gulabjamun made from cows' milk: heat-induced changes during processing and frying. **Journal Science Food Agriculture**. v. 61. p. 7-15. 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Produção brasileira de produtos lácteos de estabelecimentos sob inspeção federal**. São Paulo, 2002.

COHEN, S. H.; DAVIS, E. A.; HOLCOMB, D. N.; KALAB, M. Studies of food microstructure. **Scanning Electron Microscopy, Inc.** AMF O'Hare. 1981.

FERNANDES, AG; MARTINS, J. F. P. Fabricação de Requeijão cremoso a partir de massa obtida por precipitação ácida a quente de leite de búfala e

de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**. v. 35, n. 212, p. 7-13, nov/dez, 1980.

FERNANDES, A G. 1981. Processamento: tipos e cálculos. In: MARTINS, J. F. P.; FERNANDES, A G. **Curso sobre processamento de requeijão cremoso e outros queijos fundidos**. Campinas, ITAL, 1981, cap.7, p.1-14.

KALAB, M. **Foods under the microscope**. Update: 16/03/2000. Disponível em:< <http://anka.livstek.lth.se:2080/microscopy> > Acesso em: 26 nov. 2004.

KALAB, M. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. **Food Structure**. Chicago, v. 12. p. 95-114. 1993.

MARCHESSEAU, S. GASTALDI, E., LAGAÚDE, A., CUQ, J. L. Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 80. p. 1483-1489. 1997.

MISTRY V. V., ANDERSON, D. L. Composition and microstructure of commercial full-fat and low-fat cheeses. **Food Structure**. Chicago, v. 12. p. 259-266. 1993.

MUNCK, A.V.; CAMPOS, W. A. Requeijão: um produto brasileiro. **Informe Agropecuário**. v.42, n.115, p.35-38, 1984.

OLIVEIRA, J. S. de. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. Campinas: UNICAMP, 1986. 146p.

TAMIME, A. Y.; KALAB, M.; DAVIES, G.; YOUNIS, M. F. Microstructure and firmness of processed cheese manufactured from cheddar cheese and skim milk powder cheese base. **Food Structure**. Chicago, v.9, n.1, p.23-37, 1990.

AGRADECIMENTOS

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento através da Bolsa de Doutorado e Reserva Técnica.
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica – Depto. Biologia – Unicamp, pela colaboração e disponibilização dos equipamentos.
- Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica – DEPAN –Unicamp, pela colaboração no desenvolvimento da metodologia.