

## CAPÍTULO 1

---

# Características gerais do leite e componentes fundamentais



Este capítulo aborda a estrutura e a composição do leite e aprofunda-se no estudo das propriedades físico-químicas dos componentes mais importantes (lactose, gordura, proteínas, sais e vitaminas) e na maneira como elas são afetadas pelos processos tecnológicos mais comuns da indústria leiteira.

### DEFINIÇÃO, COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DO LEITE

---

No Primeiro Congresso Internacional para a Repressão de Fraudes realizado em Genebra, em 1908, definiu-se o leite como o produto integral, não alterado nem adulterado e sem colostro, procedente da ordenha higiênica, regular, completa e ininterrupta das fêmeas domésticas saudáveis e bem-alimentadas.

Do ponto de vista biológico, o leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos.

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, glicérides, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, etc.), das quais algumas estão em emulsão (a gordura e as substâncias associadas), algumas em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc.).

Nas tabelas de composição geral, registram-se os valores habituais de gordura, proteínas, carboidratos (quantitativamente este valor é equivalente ao da lactose), cinzas e extrato seco. Às vezes, indica-se também o extrato seco desengordurado, que é o extrato seco sem conteúdo em gordura. Na Tabela 1.1, apresenta-se a composição centesimal dos componentes mencionados. Os valores tabulados são cifras médias que servem apenas para estabelecer comparações entre o leite procedente de umas e outras espécies ou diferenças entre raças.

A gordura é o componente mais variável entre as espécies, alcançando valores extremamente elevados nos mamíferos aquáticos, como na foca. É também o componente que mais varia entre raças; de maneira geral, o conteúdo em gordura é inversamente proporcional à quantidade de leite produzido. Essas diferenças são exemplificadas na Tabela 1.1, com as raças de gado bovino Pardo suíça, Holstein e Jersey. A quantidade de proteínas está relacionada com a velocidade de crescimento do recém-nascido. Assim, os lãparos levam apenas duas semanas para dobrar o peso apresentado ao nascer e, conseqüentemente, o leite de coelha é muito mais rico em proteínas. No extremo oposto, encontra-se o leite de mulher: as crianças dobram seu peso de nascimento em cerca de 6 meses. Na lactose, encontram-se igualmente grandes diferenças, como entre o leite de mulher (6,8%) e o de canguru (traços).

Além das diferenças entre as espécies e inter-raciais, existem outras individuais que dependem da idade, fase de lactação e da alimentação, havendo, inclusive, influências sazonais e climáticas. Não vamos nos aprofundar nestes aspectos, visto que correspondem mais à disciplina de Produção Animal. Remete-se o leitor à obra já clássica de Schmidt (1974).

O colostro é o produto da secreção da glândula mamária nos primeiros dias após o parto; sua composição é bastante diferente daquela do leite. No caso particular do colostro de vaca, os diversos componentes mencionados multiplicam-se pelos seguintes fatores: o extrato seco por um fator de 2, a gordura por 1,5, as proteínas por 4, a lactose por 0,5 e as cinzas por 2. Vale destacar que o colostro, em comparação

**Tabela 1.1** Composição média do leite de diversas espécies e diferentes raças de gado bovino

		Gordura	Proteína	Lactose	Cinzas	Extrato seco
Mulher		4,5	1,1	6,8	0,2	12,6
Vaca	Parda suíça	4,0	3,6	5,0	0,7	13,3
	Holstein	3,5	3,1	4,9	0,7	12,2
	Jersey	5,5	3,9	4,9	0,7	15,0
Ovelha		6,3	5,5	4,6	0,9	17,3
Cabra		4,1	4,2	4,6	0,8	13,7
Canguru		2,1	6,2	traços	1,2	9,5
Foca		53,2	11,2	2,6	0,7	67,7
Coelha		12,2	10,4	1,8	2,0	26,4

com o leite, contém grandes quantidades de vitamina A; dá a cor ligeiramente amarelada que apresenta.

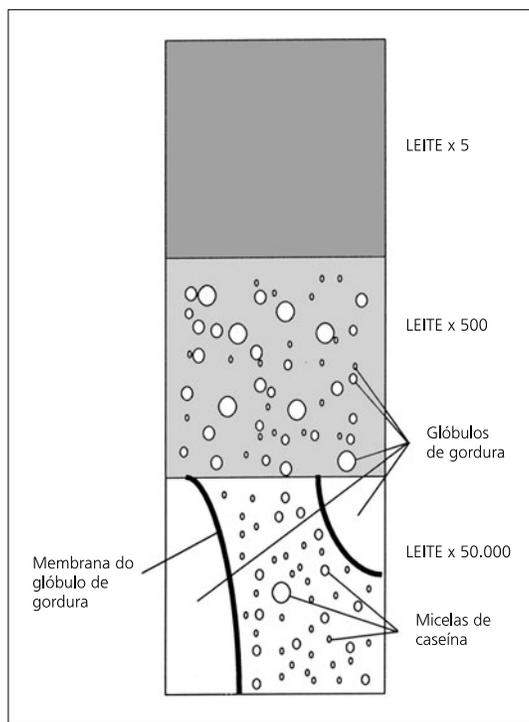
A disposição das diferentes substâncias do leite no meio aquoso varia dependendo de quais sejam elas.

Se observássemos uma gota de leite no microscópio (Figura 1.1) aumentando pouco ( $\times 5$ ), veríamos apenas um líquido uniforme e bastante turvo, indicando que nem todos os seus componentes estão em dissolução. Ao aumentar a resolução do microscópio ( $\times 500$ ), observaríamos um líquido ainda turvo no qual flutuam pequenas esferas de tamanho heterogêneo; são as gotículas de gordura em suspensão, de diâmetro variável. Se aumentássemos mais a resolução do microscópio ( $\times 50.000$ ), observaríamos um líquido transparente, o soro com as substâncias em dissolução, no qual flutuariam outras pequenas esferas, as micelas de caseína, e pedaços das gotículas de gordura que não caberiam no campo óptico. Essas gotas de gordura recebem o nome de glóbulos de gordura e compõem-se de uma série de substâncias cujas concentrações médias por 100 g de leite são:

- Glóbulo de gordura (interior): glicerídeos, 3,9 g (triglicerídeos, 3,8 g; diglicerídeos, 10 mg e monoglicerídeos, 1 mg); ácidos graxos livres, 2,5 mg; colesterol, 10 mg; carotenóides, 0,04 mg e vitaminas lipossolúveis, 0,2 mg.
- Glóbulo de gordura (membrana): proteínas, 35 mg; fosfolipídeos, 21 mg, cerebrosídeos, 3 mg; colesterol, 1,5 mg e traços de enzimas.

As micelas de caseína, por sua vez, compõem-se (em 100 g de leite) de caseínas, 2,6 g e minerais (cálcio, 80 mg; fosfatos, 95 mg; citratos, 14 mg e outros como Mg, Na, Zn, etc., cuja soma alcança um total de 15 mg).

Finalmente, no soro de 100 g de leite encontram-se: água, 87 g; lactose, 4,6 g; minerais (Ca, 37 mg; Mg, 7,5 mg; K, 134 mg; Na, 46 mg; Cl, 106 mg; fosfatos, 108 mg; sulfatos, 10 mg e bicarbonatos, 10 mg); minerais, traços (Zn, Fe, Cu, etc.);



**Figura 1.1** Distribuição e tamanho relativo dos componentes do leite.

ácidos orgânicos (citrato, 160 mg; formiato, 4 mg; acetato, 3 mg; lactato, 3 mg; etc.); ar, lipídeos, principalmente polares, traços; vitaminas (complexo B, 20 mg; vitamina C, 2 mg); proteínas (caseínas, traços;  $\beta$ -lactoglobulina, 320 mg;  $\alpha$ -lactoalbumina, 120 mg; soroalbumina, 40 mg, imunoglobulinas, 75 mg, e outras, como lactoferrina e transferrina); compostos nitrogenados não-protéicos (uréia, 30 mg; aminoácidos livres, peptídeos, 20 mg, etc.) e numerosas enzimas em quantidades traços.

## LACTOSE

A lactose é o único glicídeo livre que existe em quantidades importantes em todos os leites; e também o componente mais abundante, o mais simples e o mais constante em proporção. Costuma encontrar-se em proporções compreendidas entre 45 e 50 g/litro. Sua principal origem está na glicose do sangue; o tecido mamário isomeriza-a em galactose e liga-a a um resto de glicose para formar uma molécula de lactose. O processo é acompanhado da condensação da UDP-galactose com a D-glicose para tornar-se lactose mais UDP em uma reação catalisada pela lactose-sintetase.

A lactose pode ser um fator limitante da produção de leite, visto que as quantidades de leite produzidas na mama dependem das possibilidades de síntese de lactose.

É considerada como o componente mais lábil diante da ação microbiana, pois é um bom substrato para as bactérias, que a transformam em ácido láctico.

## Estrutura

Quimicamente, a lactose é um dissacarídeo (342 Da) formado por um resto de D-glicose e outro de D-galactose unidos por uma ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica (Figura 1.2).

A lactose aparece em duas formas isoméricas,  $\alpha$  e  $\beta$ -lactose, que diferem em suas propriedades físicas (rotação espe-

cífica, ponto de fusão, higroscopicidade e poder edulcorante fundamentalmente). No leite em pó e nos soros de leite, a lactose encontra-se em estado *amorfo*; é uma forma estável desde que não haja mais de 8% de água, pois nesse caso as moléculas apresentam mobilidade suficiente para orientar-se e poder cristalizar; essa forma de lactose aparece quando se produz desidratação brusca e aumento tão rápido da viscosidade que impede a cristalização; nesse caso, a lactose fica da mesma forma que estava na dissolução.

A lactose amorfa é muito higroscópica, ao passo que nas formas cristalinas caracteriza-se por sua baixa higroscopicidade.

Os três tipos de lactose (amorfa e  $\alpha$  e  $\beta$  cristalizadas) podem ser identificadas por difração de raios X, sendo a  $\alpha$ -lactose monohidrato a que alcança significado comercial; ela é obtida concentrando a solução em sobressaturação e posterior cristalização abaixo de 94°C. A forma  $\beta$ -anidra cristaliza acima de 94°C.

## Propriedades físicas

Neste item, estudam-se as propriedades físicas de maior interesse em Tecnologia de Alimentos.

### Poder edulcorante

A lactose tem sabor doce fraco; seu baixo poder edulcorante (6 vezes menor que o da sacarose) é considerado como uma qualidade do ponto de vista dietético, já que torna possíveis as dietas lácteas. Em parte, seu sabor doce é mascarado no leite pelas caseínas.

### Cristalização

A cristalização da lactose tem grande importância prática, não apenas porque se obtém esse açúcar mediante sua cristalização, mas também porque pode cristalizar em deter-

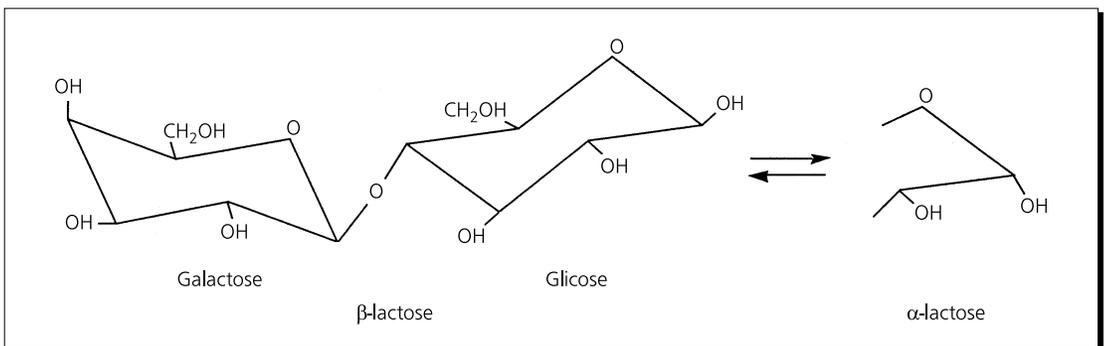


Figura 1.2 Estrutura química da  $\alpha$  e  $\beta$ -lactose.

minados produtos lácteos, como no caso dos sorvetes e do leite condensado.

As condições de cristalização influem na forma dos cristais, sendo a lactose um claro exemplo de polimorfismo cristalino. A cristalização forçada e rápida dá lugar a pequenos prismas paralelepípedais, enquanto a cristalização lenta permite observar formas variadas: pirâmides e prismas de grandes dimensões (*tomahawk*) cuja complexidade resulta da velocidade de crescimento, que não é a mesma para as diferentes faces (Figura 1.3).

Em condições normais, a cristalização é um processo lento e traz consigo o aparecimento de grandes cristais em pequena quantidade. Os cristais formados são duros e pouco solúveis e podem ser detectados pelo paladar quando seu tamanho ultrapassa 16  $\mu\text{m}$ .

Algumas substâncias impedem ou atrasam a cristalização ao serem absorvidas nos núcleos de cristalização; esse efeito pode manifestar-se ainda em pequenas doses. Um exemplo é a *riboflavina*, que em concentração de 0,25 mg/100 g impede a cristalização. Os agentes tensoativos exercem efeito semelhante. Além disso, como conseqüência da presença desses inibidores, os cristais de lactose não podem crescer por igual em todas as faces, o que justifica o aumento de sua irregularidade característica.

## Mutarrotação

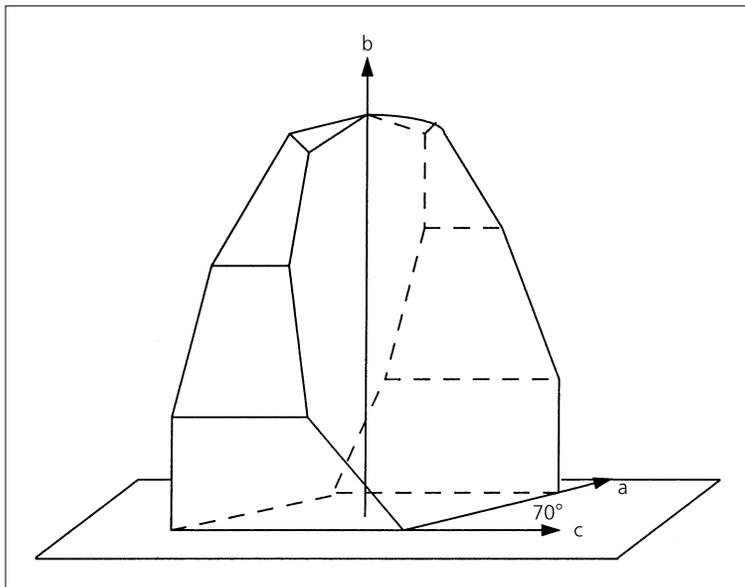
Os açúcares que possuem um ou mais átomos de carbono assimétricos são opticamente ativos, isto é, desviam o plano de polarização da luz polarizada que os atravessa. A rotação é observada e medida com um polarímetro. Cada açúcar tem sua rotação específica e característica, que dependerá de sua concentração, da temperatura e da longitude de onda. A  $\alpha$  e a  $\beta$ -lactose diferem em sua rotação específica em água a 20°C: +89,4° e + 35° respectivamente.

Quando se encontram em solução, produz-se a transformação de uma forma em outra, até alcançar o equilíbrio; esse fenômeno é acompanhado de mudança da rotação específica, recebendo o nome de mutarrotação.

Quando se alcança o equilíbrio entre as duas formas a 20°C, 37,3% é de  $\alpha$ -lactose e 62,7% de  $\beta$ -lactose. Nesse momento, a rotação específica é  $(\alpha)^{20^\circ\text{C}} = 55,3^\circ$ . A relação entre as concentrações dos dois isômeros é conhecida como constante de equilíbrio e corresponde a:

$$62,7/37,3 = 1,68$$

A constante de equilíbrio se modificará com a temperatura, mas não pelo pH; assim, a 100°C, o valor da constante é de 1,36.



**Figura 1.3** Forma característica (*tomahawk*) de um cristal de  $\alpha$ -lactose monodratada.

A mutarrotação manifesta-se, para efeitos práticos, por mudanças na solubilidade.

## Solubilidade

Ainda que a solubilidade da lactose seja baixa comparada com a de outros açúcares, as soluções de lactose podem chegar a ficar supersaturadas. Quando se prepara uma solução supersaturada de lactose, aparece uma série de forças que favorecem a formação de cristais. O ponto de supersaturação está diretamente relacionado com os requisitos energéticos (energia de nucleação) necessários para a formação de um cristal.

Entre o ponto em que se atinge a concentração de saturação e o ponto em que se situa essa concentração crítica na qual aparecem os cristais, há uma zona intermediária conhecida com o nome de *zona metaestável de supersaturação*, em que a lactose pode cristalizar em uma forma conhecida como *forçada*, ou seja, incorporando à solução núcleos de cristalização, as moléculas de lactose podem sobrepor-se a eles em camadas concêntricas que chegarão a constituir um cristal. Essa zona metaestável varia com a temperatura, com a velocidade de agitação da solução e, naturalmente, com o nível de impurezas que possam atuar como núcleos de cristalização.

Para demonstrar a existência da zona metaestável, elaboram-se os diagramas de solubilidade ou *curvas de solubilidade*, nos quais se representa a solubilidade da lactose em uma solução a várias temperaturas (Figura 1.4). A primeira curva da esquerda representa a solubilidade inicial da lactose, a seguinte, a solubilidade final, isto é, o ponto em que se alcança o equilíbrio entre os isômeros da lactose; a curva mais à direita representa o limite no qual aparece a cristalização espontânea como consequência da imobilização das moléculas e, acima dela, encontra-se uma *área lábil*, na qual a cristalização é inevitável. A área ou zona metaestável situa-se entre a curva de solubilidade final e o limite de supersolubilidade. As áreas destas regiões não estão perfeitamente definidas, mas estima-se que a cristalização forçada aparece em concentrações da ordem de 1,6 vezes a da solubilidade final e a área lábil em concentrações 2,1 vezes a solubilidade final.

## Propriedades químicas

A seguir são descritas as propriedades químicas mais importantes deste dissacarídeo.

### Propriedades redutoras

Por possuir um grupo aldeído livre, a lactose é um açúcar redutor e, com isso, pode reagir com substâncias nitroge-

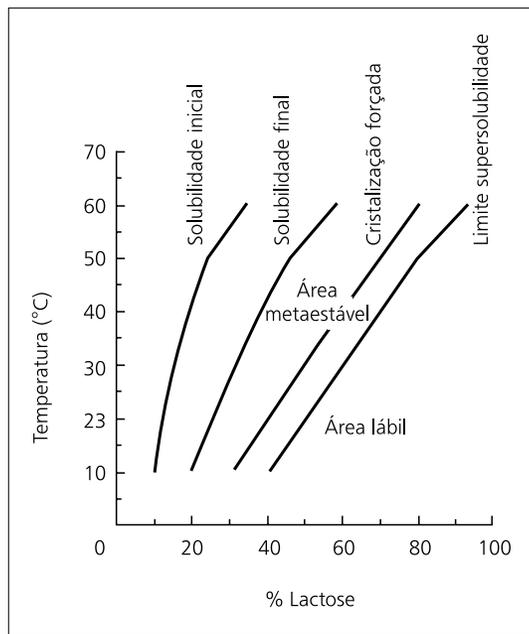


Figura 1.4 Curvas de solubilidade da lactose.

nadas, desencadeando as reações de Maillard e levando à formação de compostos coloridos (melanoidinas), de odores anômalos e à redução do valor nutritivo do leite quando a lactose reage com aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano. Do ponto de vista técnico é muito importante eliminar o ferro e o cobre, catalisadores da reação de escurecimento não-enzimático, dos materiais que estão em contato com o leite, assim como o emprego de temperaturas baixas e a manutenção de produtos desidratados em atmosferas secas.

### Adsorção de substâncias de baixo peso molecular

Essa característica justifica o poder da lactose de fixar aromas. Isso ocorre mediante o estabelecimento de pontes de hidrogênio e ligações do tipo forças de van der Waals entre a lactose e os compostos voláteis de caráter aromático.

### Hidrólise

A lactose é um dos açúcares mais estáveis. Sua hidrólise química realiza-se em meio ácido e a alta temperatura, utilizando ácidos inorgânicos ou resinas trocadoras de íons. Costumam-se aplicar tratamentos com HCl 1,5 M a 90°C durante 1 hora ou de 150°C com HCl 0,1 M. O rigor desse tratamento apresenta importantes problemas tecnológicos, não sendo, por isso, implementado em nível industrial.

Contudo, a hidrólise *enzimática* da lactose é um processo de grande interesse tecnológico, já que os compostos resultantes são facilmente fermentáveis e absorvidos pelo intestino humano. A  $\beta$ -galactosidase ou lactase é a principal enzima responsável por essa hidrólise. Trata-se de uma oxidase que hidrolisa a ligação  $\beta$ -1, 4-glicosídica e libera glicose e galactose, moléculas que o homem pode absorver com facilidade. A lactase é encontrada em pequenas quantidades no leite, nas glândulas intestinais em nível do jejuno, podendo ser produzida por algumas leveduras, bactérias e mofos: *Kluyveromyces fragilis* e *lactis*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Bacillus stearotherophilus* e as bactérias lácticas. Esses microrganismos são utilizados em nível industrial para a obtenção desta enzima.

Tem numerosas aplicações industriais, como a preparação de produtos lácteos pobres em lactose para pessoas com deficiências de lactase (problemas de intolerância à lactose), pré-hidrólise de lactose para acelerar a produção de ácido e a maturação do queijo, prevenção da cristalização da lactose em sorvetes e leites concentrados, redução da higroscopicidade em produtos lácteos desidratados e modificação das propriedades funcionais da lactose para aumentar seu uso em produtos lácteos.

### Degradação da lactose pelo calor

Durante o tratamento térmico do leite, produz-se a decomposição da lactose, dando lugar a compostos ácidos (ácidos acético, levúlico, fórmico, pirúvico), hidroximetil furfural, aldeídos, alcoóis e redutonas. Estes compostos, por sua vez, são reativos, e podem dar origem a outros compostos coloridos, que fazem aparecer no leite tonalidades escuras diferentes das que aparecem por reação de Maillard.

Um composto que aparece no leite tratado pelo calor é a *lactulose* (galactose + frutose), que pode ser utilizada como indicador de aquecimento do leite. Assim, o conteúdo em lactulose pode diferenciar entre leites pasteurizado e esterilizado. A lactulose é um pouco mais doce e mais solúvel que a lactose; considera-se que estimula o crescimento de *Lactobacillus bifidus*, sendo benéfica, portanto, para dietas infantis. Podem aparecer ainda outros derivados, como o *lactitol*, álcool procedente da redução da lactose a altas pressões, e a *epilactose* (galactose + manose).

### Fermentação

São muitos os microrganismos que metabolizam a lactose como substrato e a utilizam, dando lugar a compostos de menor peso molecular. As fermentações que produzem ácido láctico são as mais importantes para a indústria leiteira, mas há outras fermentações (propiónica e butírica) que têm importância igualmente considerável.

A fermentação *láctica* produz-se pela ação das bactérias lácticas homo- e heterofermentativas, sendo acompanhada da formação de ácido láctico (ver Capítulo 5).



A acidificação espontânea é o fenômeno mais comum observado no leite mantido na temperatura ambiente. O leite acidificado tem odor e sabor diferentes dos do ácido láctico puro pelo fato de se formarem também outros compostos, ainda que em pequena quantidade, como diacetil e acetaldeído, alguns dos quais são muito importantes no aroma de certos produtos lácteos, como manteiga e iogurtes.

A fermentação *propiónica* é realizada pela ação das bactérias do gênero *Propionibacterium*, que fermentam o ácido láctico a ácido propiónico, ácido acético,  $\text{CO}_2$  e água. Essa fermentação é típica de alguns tipos de queijo (*gruyère*), sendo o processo responsável pelo aparecimento dos *furos* característicos.

A fermentação *butírica* produz-se a partir da lactose ou do ácido láctico com formação de ácido butírico e gás. É característica das bactérias do gênero *Clostridium* e caracteriza-se pelo aparecimento de odores pútridos e desagradáveis.

Algumas leveduras (*Sacharomyces* e *Cândida*) podem transformar o ácido pirúvico em acetaldeído, que se reduz a etanol por ação da enzima álcool-desidrogenase. Em alguns países utiliza-se esse processo junto com a fermentação para o preparo de bebidas ácidas, espumantes e levemente alcoólicas, como o *kefir* e o *leben*.

### Obtenção

A lactose pode ser isolada a partir de qualquer fração aquosa do leite: leite desnatado, soro do leite e soro de manteiga. Em qualquer um deles a lactose apresenta-se em concentração de 40 a 50 g/litro. A principal fonte de lactose é o soro do leite desengordurado, que se clareia e se concentra a uma faixa entre 55 e 65°C. Durante o resfriamento, grande parte da lactose cristaliza; o produto cristalino separa-se em lactose bruta e licor *mãe*. A lactose normal é obtida após sucessivas lavagens, enquanto a de alta qualidade (uso farmacêutico) é obtida por recristalização.

### Valor nutritivo na alimentação

A lactose não é apenas uma fonte de energia, possuindo ainda valor nutritivo especial para as crianças. Tradicionalmente, considera-se que a lactose favorece a retenção de Ca, e por isso estimula a ossificação e previne a osteoporose. Atua interagindo com as vilosidades intestinais, sobretudo no nível do íleo, aumentando sua permeabilidade ao cálcio. Por-

tanto, a lactose minimiza, em parte, a deficiência de vitamina D, e sugeriu-se que alto nível de lactose poderia ajudar a combater o raquitismo. Contudo, atualmente atribui-se essa função favorecedora da assimilação do cálcio também aos peptídeos que contêm resíduos de seril-fosfato e que procedem da proteólise das caseínas.

Nos adultos, entretanto, o interesse nutritivo da lactose ainda é visto com reservas em razão dos problemas de intolerância. A origem dessa intolerância encontra-se no déficit de *β-galactosidase* produzida pelas células da mucosa intestinal; nesses casos, a lactose comporta-se como um açúcar de absorção lenta e/ou nula. Os coliformes fermentam-na, produzindo gás, que resulta em flatulência, inflamação, câibras nas extremidades e, posteriormente, diarreia e desidratação nos casos de intolerância aguda.

No entanto, a lactose não tem efeitos cancerígenos, não forma placa dentária e, no caso dos diabéticos, os níveis de glicemia são a metade dos alcançados com o consumo de glicose. Por isso, o uso de lactose é permitido, no caso dos diabéticos, em torno de 35 a 50 g/dia.

## Usos industriais

É tradicionalmente utilizada em alimentos infantis e na elaboração de comprimidos, e considerada como um açúcar de grande importância nas indústrias de elaboração de alimentos.

Em sua forma mais purificada, a lactose converteu-se em excelente excipiente de pastilhas e pílulas. Por isso, existe grande variedade de apresentações de lactose quanto a sua granulação, e hoje se conhece sua estabilidade e condições de armazenamento.

É considerada ainda, uma fonte barata de glicose pré-hidrólise, mediante enzimas imobilizadas. É adicionada também a sopas, bebidas instantâneas, misturas de especiarias, produtos cárneos e, de maneira geral, a todos os alimentos em que se requeira redução do sabor doce, potencialização do aroma, longa vida útil e preço aceitável.

## Outros carboidratos

Além da lactose, existem no leite outros carboidratos, como glicose e galactose livres. Outros carboidratos que podem ser encontrados são os nitrogenados (n-acetil glicosamina e N-acetil-galactosamina), os ácidos (ácidos siálicos) e os neutros (poliosídeos que contêm fucose). Todos eles aparecem em quantidades residuais.

## LIPÍDEOS

Em termos gerais, a gordura do leite pode ser definida como o conjunto de substâncias passíveis de serem extraídas pelo método de Röse-Gottlieb, que consiste basicamente em uma extração com éter de petróleo e éter dietílico, ou pelo método de Gerber, que consiste em uma digestão ácida com ácido sulfúrico e posterior centrifugação.

De todos os componentes do leite, a fração que mais varia é formada pelas gorduras, cuja concentração oscila entre 3,2 e 6% (Tabela 1.2). Fundamentalmente, a raça, a época do ano, a zona geográfica e o manejo dos criadores de gado são os fatores que mais influem na concentração lipídica do leite. Apesar das variações podem-se tirar algumas conclusões gerais; assim, os lipídeos apolares constituem em torno de 98,5% do total e os apolares, o restante 1,5%. No que se refere à composição dos ácidos graxos, foram identificados mais de 150, dos quais os majoritários na gordura do leite de vaca são os ácidos mirístico (8 a 15%), palmítico (20 a 32%), esteárico (7 a 15%) e oléico (15 a 30%). Em torno de 60% são saturados, 35% são monoenoícos e 5% polienoícos. Na Tabela 1.3, são apresentados os ácidos graxos majoritários de leites de diferentes origens.

Os triglicerídeos são os componentes majoritários das espécies estudadas, constituindo mais de 95% do total de lipídeos. São sempre acompanhados de pequenas quantidades de di e monoglicerídeos, de colesterol livre e seus ésteres, de ácidos graxos livres e fosfolipídeos, e ainda de glicolipídeos e de outros componentes minoritários, como vitaminas lipossolúveis.

## O glóbulo de gordura

A gordura encontra-se dispersa no leite em forma de glóbulos esféricos visíveis no microscópio, com diâmetro de 1,5 a 10  $\mu\text{m}$  (em média, 3-5  $\mu\text{m}$ ), dependendo da espécie e das raças dos animais. Na Tabela 1.4, apresenta-se a distribuição dos componentes da gordura láctea dentro e fora do glóbulo de gordura. Os glóbulos são constituídos de um núcleo central que contém a gordura, envolvidos por uma película de natureza lipoprotéica conhecida com o nome de *membrana*.

A origem dos glóbulos de gordura situa-se nas vesículas do retículo endoplasmático das células do epitélio mamário, que se carregam de triglicerídeos. Após sua formação, as gotas de gordura vão crescendo ao se unirem umas às outras, migram para a superfície da célula e dali passam à luz alveolar. No interior do glóbulo de gordura, os triglicerídeos distri-

**Tabela 1.2** Composição (%) da fração lipídica do leite de vaca

Lipídeos apolares (≈ 98,5)	Glicerídeos	Triglicerídeos	≈ 98
		Diglicerídeos	≈ 0,3
		Monoglicerídeos	≈ 0,03
	Ácidos graxos livres		≈ 0,1
Lipídeos polares (≈ 1,5)	Insaponificáveis	Colesterol	≈ 0,3
		Ésteres do colesterol	≈ 0,02
		Carotenóides	≈ 0,002
		Vitaminas A, E, D	
	Fosfolipídeos	Fosfatidilcolina	≈ 0,26
		Fosfatidiletanolamina	≈ 0,28
		Fosfatidilserina	≈ 0,03
		Fosfatidilinositol	≈ 0,04
		Esfingomiéline	≈ 0,16
		Lecitina	≈ 0,26
Cerebrosídeos		≈ 0,1	
Gangliosídeos		≈ 0,01	

**Tabela 1.3** Ácidos graxos majoritários (%) do leite

Ácido graxo	Vaca	Ovelha	Cabra	Mulher
C-4:0	3,3	4	2,6	
C-6:0	1,6	2,8	2,9	Tr
C-8:0	1,3	2,7	2,7	Tr
C-10:0	3	9	8,4	1,3
C-12:0	3,1	5,4	3,3	3,1
C-14:0	9,5	11,8	10,3	5,1
C-16:0	26,3	25,4	24,6	20,2
C-16:1	2,3	3,4	2,2	5,7
C-18:0	14,6	9	12,5	5,9
C-18:1	29,8	20	28,5	46,4
C-18:2	2,4	2,1	2,2	13
C-18:3	0,8	1,4		1,4
C-20 a C-22	Tr			Tr

Tr.: Traços.

Fonte: Fox (1994).

**Tabela 1.4** Distribuição (%) dos lipídeos no leite de vaca

Lipídeos	Interior glóbulo	Membrana glóbulo	Soro
Glicerídeos neutros			
Triglicerídeos	100	Tr	Tr
Diglicerídeos	90	10	ND
Monoglicerídeos	Tr	Tr	Tr
Ácidos graxos livres	60	10	30
Fosfolipídeos	ND	65	35
Cerebrosídeos	ND	70	30
Gangliosídeos	ND	70	30
Esteróis	80	10	10

buem-se de tal forma que os insaturados situam-se no centro da gota de gordura, enquanto os saturados dispõem-se na periferia, formando um elemento de continuidade com a fração glicéridica da mesma natureza que eles, que faz parte da membrana.

A membrana do glóbulo de gordura atua como barreira protetora, impedindo que os glóbulos floculem e se fundam. Ao mesmo tempo, protege a gordura da ação enzimática. Todas as interações entre a gordura e o soro produzem-se por meio dela. A superfície total de membrana é grande (80 m<sup>2</sup> em um litro) e contém ainda substâncias reativas e enzimas. Conseqüentemente, a membrana determina em grande parte as reações como a lipólise e a oxidação.

Mediante microfotografias eletrônicas, pode-se observar que a membrana do glóbulo de gordura resulta em grande parte da membrana externa (plasmalema) da porção apical celular e da correspondente ao complexo de Golgi. Sua composição corresponde, portanto, à das membranas biológicas, mas estudos realizados com microscópio eletrônico demonstraram considerável redistribuição dos componentes imediatamente após sua formação.

### **Composição da membrana do glóbulo de gordura**

A composição geral da membrana dos glóbulos de gordura do leite de vaca é apresentada na Tabela 1.5. A composição da membrana varia de um lote a outro, de um glóbulo do mesmo lote a outro e de um lugar a outro do mesmo glóbulo. Em geral, as proteínas e os lipídeos constituem 90% do peso seco da membrana, embora essa relação varie conforme o estado de lactância, a idade, a estação do ano e o tratamento do leite. O estudo analítico revela a presença dos seguintes componentes:

1. A fração lipídica constitui 48% dos componentes da membrana. A maioria são fosfolipídeos e triglicerídeos com elevado ponto de fusão; cerca de 60% da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina do leite encontram-se na membrana. Quanto aos triglicerídeos, mais de 75% dos ácidos graxos totais correspondem a ácido palmítico (C-16:0) e ácido esteárico (C-18:0). O ácido oléico (C-18:1n-9) está presente em quantidade muito pequena e os polinsaturados são encontrados em níveis muito baixos. Há também pequenas quantidades de mono e diglicerídeos e de componentes insaponificáveis (colesterol e carotenóides).
2. A fração protéica constitui 48% do total dos componentes da membrana; apresenta padrão complexo de polipeptídeos cujo peso molecular oscila entre 11.000 e 250.000. Há também glicoproteínas (pelo menos 6 diferentes). Algumas das proteínas da membrana do glóbulo

**Tabela 1.5** Composição da membrana do glóbulo de gordura do leite de vaca

Componente	Quantidade
Proteína	25 a 60% peso seco
Lipídeos totais	0,5 a 1,2% mg/mg proteína
Fosfolipídeos	0,13 a 0,34% mg/mg proteína
Fosfatidilcolina	34% dos fosfolipídeos totais
Fosfatidiletanolamina	28% dos fosfolipídeos totais
Esfingomielina	22% dos fosfolipídeos totais
Fosfatidilinositol	10% dos fosfolipídeos totais
Fosfatidilserina	6% dos fosfolipídeos totais
Lipídeos neutros	56 a 80% do total de lipídeos
Glicerídeos	53 a 74% do total de lipídeos
Ácidos graxos livres	0,6 a 6,3% do total de lipídeos
Hidrocarbonetos	1 a 2% do total de lipídeos
Esteróis	0,2 a 5,2% do total de lipídeos
Cerebrosídeos	3,5 nmols/mg proteína
Gangliosídeos	6 a 7,4 nmols/mg proteína
Ácidos siálicos	63 nmols/mg proteína
Hexonas	0,6 μmols/mg proteína
Hexosaminas	0,3 μmols/mg proteína

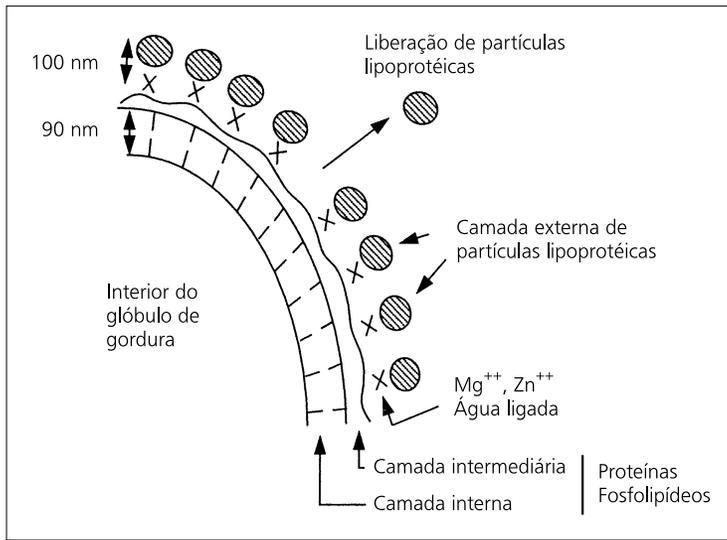
de gordura são metaloproteínas (enzimas e citocromos). A membrana contém pelo menos 10 enzimas diferentes, entre as quais destacam-se, por sua abundância, a fosfatase alcalina e a xantina-oxidase, que constituem, cada uma delas, em torno de 10% do total de proteínas da membrana. É possível encontrar também catalase e aldolase.

3. Substâncias diversas, como riboflavina e ARN.

### **Estrutura da membrana do glóbulo de gordura**

A membrana do glóbulo é uma estrutura complexa na qual se podem distinguir três camadas diferentes (Figura 1.5):

1. Camada *interna*, semelhante a uma membrana celular, constituída por proteínas de estrutura similar à das globulinas, e por fosfolipídeos, fundamentalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina. Essa camada é muito resistente, e sua função é isolar o glóbulo de gordura. Apenas possui atividade enzimática. Encontra-se firme-



**Figura 1.5** Estrutura da membrana do glóbulo de gordura.

mente unida à parte externa do núcleo do glóbulo de gordura, constituída por uma camada de triglicérides com alto ponto de fusão.

2. Camada *intermediária*, na qual se encontra água ligada e metais como cobre, ferro e zinco que se fixam facilmente na membrana, alcançando, deste modo, as proximidades dos lipídeos cuja oxidação podem catalisar. Atribui-se à proteína de membrana e à água unida grande influência na capacidade de dispersão da gordura no leite.
3. Camada *externa*, onde se localizam as atividades enzimáticas. É composta por partículas lipoprotéicas independentes, mais ricas em fosfolípidos e proteínas que a camada interna.

A integridade dos glóbulos de gordura determina a estabilidade da gordura no leite. Qualquer alteração da membrana favorece a aproximação e a coalescência dos glóbulos que emergem à superfície do leite muito mais depressa que os glóbulos isolados (separação da nata ou *desnate*). Quando se rompe a membrana e o glóbulo perde sua individualidade, a união dos glóbulos torna-se irreversível, e a emulsão perde sua estabilidade.

### Auto-aglutinação

Quando o leite cru é mantido a temperaturas de refrigeração, observa-se separação rápida da nata. Este fato se deve à formação de grandes agregados de glóbulos de gordura, às

vezes de tamanho superior a 1 mm, podendo conter até um milhão de glóbulos e entre 10 e 60% de gordura (v/v). Os agregados apresentam forma e tamanho irregulares; a baixa temperatura são volumosos e firmes porque retêm soro em seu interior; a *linha de nata* que se obtém é espessa. Em temperatura maior, os agregados são pequenos e compactos.

O principal agente responsável por essa aglutinação é uma imunoglobulina (IgM) procedente do colostro ou do leite. A IgM é uma molécula grande (900.000 Da), que possui 10 pontos ativos pelos quais pode unir-se a outras moléculas; devido a seu tamanho, pode atuar como ponto de união entre partículas apesar das repulsões eletrostáticas que podem surgir a curta distância entre várias moléculas. Adsorve-se na superfície dos glóbulos de gordura, unindo uns aos outros e provocando sua agregação; por isso, essa proteína é conhecida com o nome de *aglutinina*. A adsorção da aglutinina na superfície dos glóbulos ocorre quando estes se encontram em estado sólido ou semi-sólido, isto é, a baixas temperaturas, mas não quando a gordura está em estado líquido, ou seja, a altas temperaturas, devido à desnaturação protéica. O pH influi na aglutinação, dado que a acidificação do leite implica uma redução das cargas negativas das membranas, o que favorece a aglutinação. Outro fator a ser considerado é o tamanho do glóbulo; quanto menor é o glóbulo, maior é a área superficial e, portanto, requer-se mais aglutinina para provocar a união dos glóbulos do que quando estes são grandes. De fato, no leite homogeneizado não se produz aglutinação pelo frio, a não ser que se adicione grande quantidade de aglutinina.

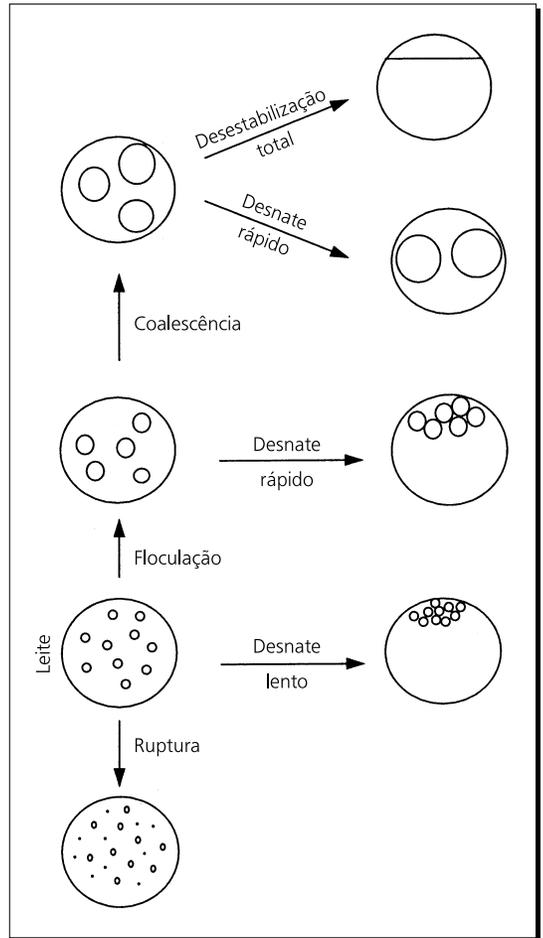
## Coalescência

O leite é uma emulsão e, como tal, pode apresentar mudanças físicas (Figura 1.6). A coalescência é a fusão de duas gotas de uma emulsão em uma única. Esse fenômeno é acompanhado da ruptura da membrana que separa e individualiza duas gotas que estão muito próximas uma da outra. Portanto, a coalescência está diretamente relacionada com a espessura da membrana e com a sua estabilidade em função da tensão superficial entre as fases aquosa e gordurosa. Assim, a presença de cristais (gordura sólida) na superfície do glóbulo de gordura favorece a coalescência, já que podem romper a membrana e favorecer a fusão do conteúdo dos glóbulos afetados. Contudo, se a cristalização é total, a coalescência não é possível, visto que as partículas sólidas podem flocular, mas não podem se fundir.

A energia de ativação necessária para a coalescência geralmente é tão grande que a segregação ou separação pode atrasar indefinidamente. Para conseguir coalescência alta pode-se aplicar energia, por exemplo, mediante agitação. Essa operação aumenta a possibilidade de que os glóbulos se encontrem e, conseqüentemente, de que floculem ou se produza a coalescência. Portanto, quanto maior for o conteúdo de gordura, maior será a probabilidade de ocorrer a coalescência.

O fenômeno da coalescência é afetado pelos seguintes fatores:

- **Agitação.** É o fator mais importante de todos, pois quanto maior for a agitação, mais acentuada será a coalescência. Se uma parte da gordura estiver sólida, a coalescência durante a agitação será mais acentuada.
- **Temperatura.** A temperatura condiciona a coalescência já que influi na proporção de gordura sólida do glóbulo, mas, além disso, provoca aumento da viscosidade, que favorece a aproximação entre os glóbulos.
- **Conteúdo de gordura.** Quanto maior for o conteúdo de gordura, maior é a coalescência durante a agitação; isso se deve ao fato de que os glóbulos de gordura estão tanto mais unidos quanto maior é o conteúdo de gordura.
- **Congelamento.** O congelamento da nata provoca a coalescência parcial porque os cristais de gelo lesionam as membranas dos glóbulos de gordura.
- **Membrana do glóbulo de gordura.** A degradação parcial dos fosfolípidos, mediante aditivos ou enzimas bacterianas, introduz modificações na membrana do glóbulo, afetando sua estabilidade.
- **Tamanho do glóbulo.** Quanto menor for o glóbulo, maior será a estabilidade diante da coalescência. Por isso, o leite homogeneizado é mais estável que o leite sem homogeneizar.



**Figura 1.6** Formas de desestabilização da emulsão láctea.

## Fusão e cristalização

Em termos gerais, o ponto de fusão de uma mistura de triglicerídeos depende dos ácidos graxos que constituem as moléculas. O ponto de fusão dos triglicerídeos varia de aproximadamente  $-40$  a  $72^{\circ}\text{C}$ . Isso não significa que se trate do intervalo de fusão da gordura láctea; seu ponto de fusão normal situa-se em torno de  $37^{\circ}\text{C}$ .

A cristalização da gordura tem grande importância prática, já que dela dependem em grande parte a estabilidade dos glóbulos de gordura e a consistência dos produtos ricos em gordura (manteiga).

A cristalização da gordura láctea é um fenômeno muito complexo devido à quantidade e à variedade de trigliceríde-

os que a compõem. Em termos gerais, a gordura do leite é líquida acima de 40°C e completamente sólida a -40°C. Entre esses dois extremos, há uma mistura de cristais e gordura.

É importante considerar que a cristalização da gordura do leite comporta-se de forma diferente da cristalização da mesma gordura fora do glóbulo, já que a estrutura globular limita o tamanho dos cristais. Além disso, a proteção que o glóbulo de gordura exerce faz com que seja necessário resfriamento superior para iniciar a cristalização. O processo de cristalização começa no nível da membrana do glóbulo, que atuaria como núcleo de cristalização. A partir desse momento, formam-se pequenos cristais em forma de agulha que aos poucos vão aumentando de tamanho, formando-se uma rede aleatória que proporciona ao glóbulo estrutura firme. Durante o processo de armazenamento em refrigeração, produz-se o depósito de moléculas sobre esse cristal inicial, seguindo uma direção tangencial ao longo do glóbulo.

## Principais alterações que afetam os lipídeos

São a lipólise e a auto-oxidação.

### Lipólise

A hidrólise dos triglicerídeos provoca o aumento de fração de ácidos graxos livres, conferindo aos produtos lácteos sabor de ranço ou *de sabão*; os ácidos de C-4 a C-12 são os principais responsáveis por esse sabor. A intensidade da lipólise expressa-se como acidez ou como *índice de acidez* da gordura em milimol de ácido graxo livre por 100 g de gordura, começando-se a perceber o gosto de ranço quando a acidez da gordura é da ordem de 1,4 mmol/100 g.

O leite possui uma *lipase* endógena; sua temperatura ótima de atuação é de 37°C e seu pH ótimo situa-se em torno de 8; sua atividade é estimulada pela presença de íons cálcio. É uma enzima muito ativa, mas sua ação é limitada por diversos fatores:

- O pH do leite (6,7) desvia-se do ponto ótimo de atuação.
- A temperatura do leite (refrigeração) é sempre inferior à ótima da lipase.
- Está unida em grande parte às micelas de caseína, com o que diminui a concentração de enzima livre e, portanto, sua atividade.
- A membrana do glóbulo de gordura protege os triglicerídeos do ataque enzimático, já que a enzima não pode atravessá-la com facilidade.
- A lipase é instável, perdendo lentamente sua atividade; a instabilidade é maior à medida que aumenta a temperatura e diminui o pH. A enzima torna-se inativa com o

aquecimento a 75°C durante 20 segundos, condições muito próximas às da pasteurização.

Além da lipase endógena, pode haver outras enzimas de origem microbiana. Em geral são lipases extracelulares produzidas, fundamentalmente, por bactérias psicotróficas, *Pseudomonas* e enterobactérias. Essas lipases atuam otimamente com pH alcalino e em temperaturas entre 40 e 50°C. São muito estáveis termicamente e inclusive algumas resistem a tratamentos UHT. Alguns microrganismos psicotróficos podem produzir esterases que atacam preferencialmente substratos solúveis com ácidos graxos de cadeia curta, sobretudo a tributirina, melhor que os triglicerídeos de cadeia longa.

Finalmente, vale dizer que o fenômeno lipolítico nem sempre é prejudicial, já que alguns tipos de queijos (queijo azul, *cheddar* ou *gouda*) devem seu sabor, em parte, à presença de ácidos graxos livres.

### Auto-oxidação

O processo de auto-oxidação da gordura é uma reação química que afeta os ácidos graxos insaturados livres ou esterificados. Essa reação é dependente do oxigênio, sendo catalisada pela luz, pelo calor e por metais como Fe e Cu. Os principais produtos da reação (hidroperóxidos) não têm aroma, porém são instáveis e degradam-se formando numerosas substâncias, especialmente carbonilas insaturadas de C-6 e C-11 e alguns álcoois e ácidos. Os aromas estranhos resultantes são conhecidos comumente como *ranço*.

A auto-oxidação da gordura láctea inicia-se nos fosfolipídeos, que são mais ricos em ácidos graxos insaturados e, além disso, estão em contato com o catalisador principal: o cobre. O papel do cobre é essencial e depende de sua concentração na membrana do glóbulo de gordura (em torno de 10 µg/100 g de glóbulos de gordura). A quantidade de cobre presente de forma natural (*cobre natural*) no leite pode aumentar pela presença de cobre procedente de contaminações a partir da superfície do úbere, do equipamento de ordenha e processamento e da água (*cobre adicionado*); esse cobre adicionado é mais ativo como catalisador que o natural. Outras substâncias, também envolvidas na auto-oxidação, são o ácido ascórbico, indispensável para a oxidação induzida pelo cobre, metaloproteínas (peroxidase, xantina oxidase) e o tocoferol (antioxidante natural), cuja presença depende da alimentação da vaca. A oxidação da gordura também pode ser induzida pela luz, sobretudo a de longitude de onda curta; assim, a exposição direta à luz solar desenvolve sabor de *ranço* no leite em apenas 12 horas.

### Homogeneização

Essa operação tem como objetivo prolongar a estabilidade da emulsão da gordura reduzindo mecanicamente o ta-

manho dos glóbulos até atingir um diâmetro em torno de 1 a 2  $\mu\text{m}$ . A diminuição do tamanho dos glóbulos evita a floculação e, portanto, impede que a nata se separe.

O processo consiste, basicamente, em submeter o leite a grande pressão e forçá-lo a passar por uma abertura estreita; cria-se grande energia cinética e, ao final, rompe-se o glóbulo de gordura. O tamanho dos novos glóbulos dependerá da pressão aplicada.

Realiza-se o processo em um *homogeneizador* cujo funcionamento é o seguinte (Figura 1.7): o leite, entre 65 e 70°C entra com forte pressão (25 MPa) em um tubo em cujo extremo encontra-se uma verga cônica de aço ou ágata que se mantém na posição desejada graças a um sistema de regulação externo; o leite deve vencer a resistência oferecida pela trava e abrir caminho entre ela e a parede. A ruptura dos glóbulos se produz pelo choque com a trava e pela laminação que sofrem ao sair por um canal tão estreito. Nesse momento, o leite expande-se e provoca a explosão dos glóbulos.

A homogeneização pode ser feita em *duas fases* (Figura 1.8). Esse processo consiste em fazer o leite passar por uma segunda válvula a pressão menor (3,5 a 5 MPa). Com isso, evita-se o reagrupamento dos glóbulos e consegue-se que a emulsão tenha maior estabilidade.

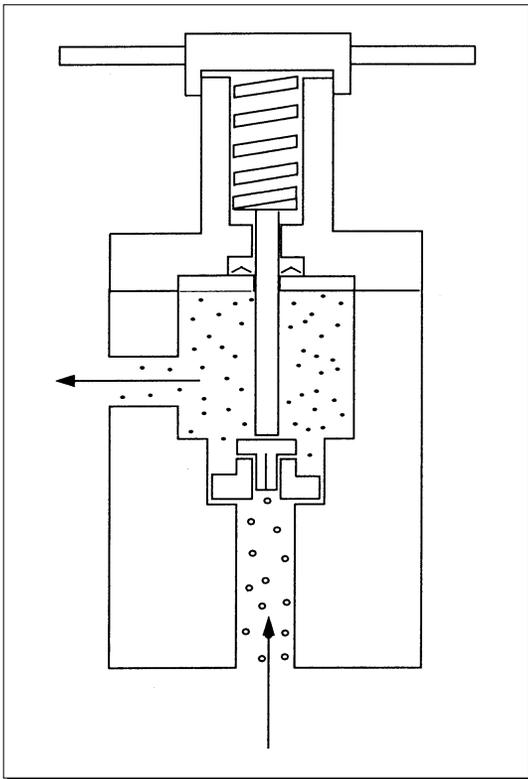


Figura 1.7 Corte transversal de um homogeneizador.

## Efeitos da homogeneização

Além da redução do tamanho dos glóbulos, que é o principal efeito desejado, a homogeneização provoca uma série de efeitos secundários:

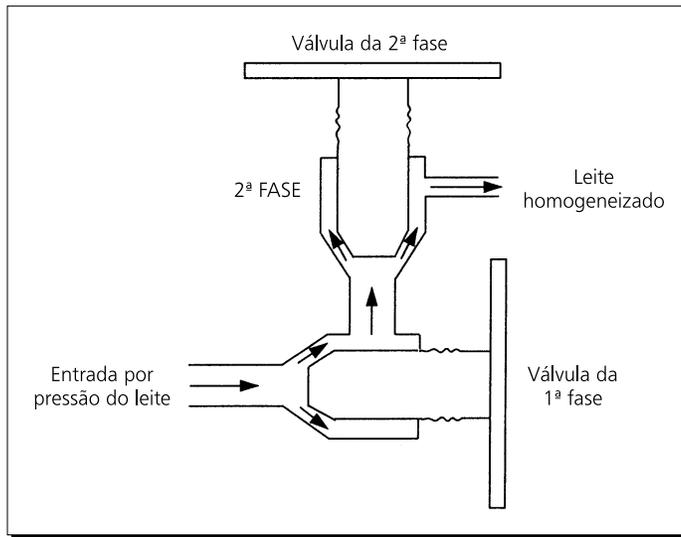
1. Modificação da membrana. A homogeneização aumenta consideravelmente a superfície total dos glóbulos de gordura. Os componentes originais da membrana não são suficientes para recobrir os novos glóbulos que se formam. Por isso, reestrutura-se espontaneamente formando uma nova membrana (Figura 1.9), que inclui restos da antiga e de novas proteínas (caseínas e proteínas do soro), fazendo com que a fração protéica aumente cerca de quatro vezes.
2. A cor se torna mais branca em razão de maior efeito dispersante da luz.
3. Aumenta a tendência a formar espuma devido ao maior conteúdo protéico da membrana, sobretudo devido às proteínas do soro.
4. A nova membrana não protege a gordura tão bem quanto a membrana original. Por isso, as lipases, de estrutura protéica, aderem parcialmente à superfície da gordura e chegam mais facilmente aos triglicerídeos do interior.
5. Diminui a tendência à auto-oxidação porque os cátions localizados na membrana, especialmente o cobre, migram para o soro.
6. O recobrimento parcial dos glóbulos com caseína faz com que eles se comportem como se fossem grandes micelas. Qualquer reação que dê lugar à agregação das micelas (acidificação ou aquecimento excessivo) provocará a agregação dos glóbulos homogeneizados.

Durante a homogeneização e antes que se forme a nova membrana, os glóbulos parcialmente desnudos batem uns nos outros, unindo-se ao mesmo tempo com uma micela de caseína, formando *grumos de homogeneização*. Aparecem na saída da válvula do homogeneizador, onde a intensidade da turbulência é baixa demais para romper os grumos, mas suficiente para permitir que os glóbulos parcialmente desnudos se choquem. A segunda fase de homogeneização permite a separação desses glóbulos e seu recobrimento pela nova membrana.

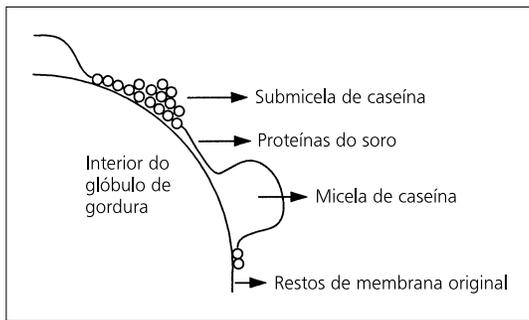
Normalmente os grumos têm cerca de  $10^6$  glóbulos, e a principal conseqüência de sua formação é o aumento da viscosidade, que pode chegar a multiplicar-se 30 vezes.

## SUBSTÂNCIAS NITROGENADAS

Essas substâncias podem ser classificadas, em função de seu grau de solubilidade, em ácido tricloroacético (TCA), em proteínas, insolúveis em TCA a 12,5% e nitrogenógenos não-pro-



**Figura 1.8** Esquema do funcionamento de um homogeneizador de dupla fase.



**Figura 1.9** Membrana do glóbulo de gordura após a homogeneização.

téico (NPN), fração na qual se incluem todos os compostos que contêm nitrogênio e são solúveis em TCA a 12,5%. Os compostos nitrogenados mais importantes do leite, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo, são as proteínas. Sua importância se deve a diversos fatores. Seu papel fundamental, obviamente, é nutritivo, pois têm de suprir as necessidades de aminoácido do lactente.

Igualmente essencial para a vida do lactente é o caráter imunológico de algumas proteínas (imunoglobulinas) contidas no leite e, sobretudo, no colostro (até 10% do colostro em peso pode ser de imunoglobulinas), que conferem imunidade passiva. Outra propriedade relevante é a atividade biológica devido à abundância de enzimas (proteases, fosfatases, etc.) presentes no leite. É preciso destacar também as

propriedades físico-químicas das proteínas lácteas, que permitem a aplicação de operações tecnológicas, como a esterilização, a concentração, etc., sem modificar de forma significativa o valor nutritivo e as propriedades sensoriais do leite.

Na Tabela 1.6, apresenta-se a composição em substâncias nitrogenadas do leite de vaca. Cerca de 95% do nitrogênio aparece em forma protéica, sendo as proteínas mais abundantes as caseínas e, dentro destas, as  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ . As quatro caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) possuem estrutura primária diferente e bem-conhecida, enquanto as  $\gamma$  surgem da hidrólise da  $\beta$ -caseína por ação da plasmina. Entre o grande número de proteínas do soro existentes, vale destacar a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoalbumina.

## Proteínas do leite

As caseínas e as proteínas do soro diferenciam-se (ver Tabela 1.7) por sua origem e características químicas. Do ponto de vista tecnológico, as diferenças mais destacáveis são:

- Sua solubilidade distinta a pH 4,6: as proteínas do soro são solúveis e as caseínas não (esse pH é o ponto isoelétrico destas). Graças a esta característica, fabrica-se iogurte, por exemplo, e podem separar-se facilmente as duas espécies protéicas.
- A capacidade de algumas proteases de coagular as caseínas e formar gel (base da indústria de queijo), enquanto as proteínas do soro são insensíveis à enzima.

**Tabela 1.6** Concentração média de substâncias nitrogenadas (% nitrogênio total) do leite de vaca

PROTEÍNAS	95
Caseínas	76
$\alpha_{s1}$	30
$\alpha_{s2}$	8
$\beta$	27
$\kappa$	9
$\gamma$	2
Proteínas do soro	19
$\beta$ -lactoglobulina	9,5
$\alpha$ -lactoalbumina	3,5
Soroalbumina bovina	1,0
Imunoglobulinas	2,0
Outras	3,0
NITROGÊNIO NÃO-PROTÉICO	5
Peptídeos	
Aminoácidos livres	
Outras substâncias	

- A termorresistência das caseínas, que permite a esterilização do leite sem que geleifique. As proteínas do soro se desnaturam pela ação do calor.

Outras diferenças são:

- O fósforo das caseínas aparece sob a forma de resíduos de ácido ortofosfórico unidos mediante ligações éster com o -OH dos resíduos serina. O número de moléculas de fósforo varia de uma caseína a outra. A  $\alpha_{s1}$  contém normalmente 8 resíduos fosfato e, às vezes, 9; a  $\alpha_{s2}$ , de 10 a 13; a  $\beta$ , 5 e algumas vezes 4; e a  $\kappa$  em geral 1, eventualmente 2 e muito raramente 3.
- No que se refere à quantidade de enxofre, todo ele se encontra em forma de metionina na  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ -caseínas, enquanto nas outras caseínas ( $\alpha_{s2}$  e  $\kappa$ ), além dos resíduos de metionina correspondentes, encontram-se dois resíduos de cisteína por molécula. A presença desses resíduos, com grupos -SH que podem estar livres, é muito importante porque permite a união dessas proteínas com as outras mediante ligações dissulfeto.

**Tabela 1.7** Diferenças mais importantes entre caseínas e proteínas do soro

	Caseínas	Proteínas do soro
Solubilidade a pH 4,6	Não	Sim
Coagulação por quimosina	Sim	Não
Termorresistência	Sim	Não
Fósforo	Sim	Não
Enxofre	0,8% (fundamentalmente Met)	1,7% (Met e Cys)
Origem	Glândula mamária	Glândula mamária e plasma
Estado	Coloidal	Em dissolução

- Todas as caseínas são sintetizadas na glândula mamária, enquanto algumas proteínas do soro (p. ex., imunoglobulinas, transferrina e soroalbumina) chegam ao leite procedentes do plasma e outras são de origem mamária ( $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina).
- As caseínas formam partículas coloidais (as micelas), enquanto as proteínas do soro encontram-se dissolvidas na fase aquosa do leite.

### Estrutura primária das caseínas

No década de 1970, determinou-se a seqüência aminoácida das quatro caseínas. Nessa mesma década, começaram-se a descobrir as variantes genéticas de cada uma delas (também foram descritas variantes genéticas das proteínas do soro). Essas variantes diferenciam-se umas das outras em um aminoácido ou em um grupo deles. Por exemplo, o resíduo aminoácido número 192 da variante B da caseína  $\alpha_{s1}$  (típica das raças de vacas do Ocidente) é ácido glutâmico, enquanto na variante C (típica do gado indiano) é uma molécula de glicina; a variante A (pouco freqüente) perdeu um grupo de aminoácidos, exatamente aqueles compreendidos entre os restos 14 e 26 da cadeia completa. Na Tabela 1.8, apresenta-se a composição aminoácida das caseínas típicas do leite das raças bovinas da Europa e do mundo ocidental em geral.

Todas as caseínas contêm quantidade elevada de aminoácidos apolares, e por isso seria provável reduzida solubilida-

**Tabela 1.8** Composição aminoacídica das caseínas,  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina típicas do leite de gado bovino ocidental

Aminoácido	$\alpha_{s1}$ -caseína	$\alpha_{s2}$ -caseína	$\beta$ -caseína	$\kappa$ -caseína	$\alpha$ -lactoalbumina	$\beta$ -lactoglobulina
Asp	7	4	4	4	9	11
Asn	8	14	5	7	12	5
Thr	5	15	9	14	7	8
Ser	8	6	11	12	7	7
Ser P	8	11	5	1	0	0
Glu	24	25	18	12	8	16
Gln	15	15	21	14	5	9
Pro	17	10	35	20	2	8
Gly	9	2	5	2	6	3
Ala	9	8	5	15	3	14
Cys	0	2	0	2	8	5
Val	11	14	19	11	6	10
Met	5	4	6	2	1	4
Ile	11	11	10	13	8	10
Leu	17	13	22	8	13	22
Tyr	10	12	4	9	4	4
Phe	8	6	9	4	4	4
Trp	2	2	1	1	4	2
Lys	14	24	11	9	12	15
His	5	3	5	3	3	2
Arg	6	6	4	5	1	3
PyroGlu	0	0	0	1	0	0
Total:	199	207	209	169	123	162
Peso molecular	23.612	25.228	23.980	19.005	14.174	18.362

de em água, mas a relativa abundância de grupos fosfatos, a escassez de enxofre e a presença de um grupo carboidrato, muito polar, em número elevado de moléculas  $\kappa$ -caseína fazem com que essas proteínas tenham solubilidade mais do que aceitável em água. De fato, o verdadeiro fator limitante no momento de obter soluções de caseína muito concentradas é sua elevada viscosidade, mais do que a solubilidade da proteína. Como já dissemos, a  $\kappa$ -caseína pode estar glicosilada. A unidade básica do grupo glicosídeo pode ser formada por 3 ou 4 moléculas: uma de galactose, outra de N-acetilgalactosamina e uma ou duas de ácido siálico (neuramínico)

(Figura 1.10) unidas covalentemente a um resíduo de treonina, provavelmente o 131, da  $\kappa$ -caseína. As  $\kappa$ -caseínas, por sua vez, podem conter 1, 2, 3 e mesmo 4 unidades glicosídicas ou carecer dela. No colostro há abundância maior de  $\kappa$ -caseínas ricas em carboidratos.

As caseínas são ricas em prolina. A  $\alpha_{s1}$  contém 17 resíduos, a  $\alpha_{s2}$  10, a  $\beta$  35 e a  $\kappa$  20. A presença desse aminoácido na cadeia polipeptídica de uma proteína provoca alterações no ângulo de giro da ligação peptídica, pois o grupo amino da prolina é secundário. As mudanças na cadeia aminoacídica impedem que os resíduos de aminoácidos próximos se rela-

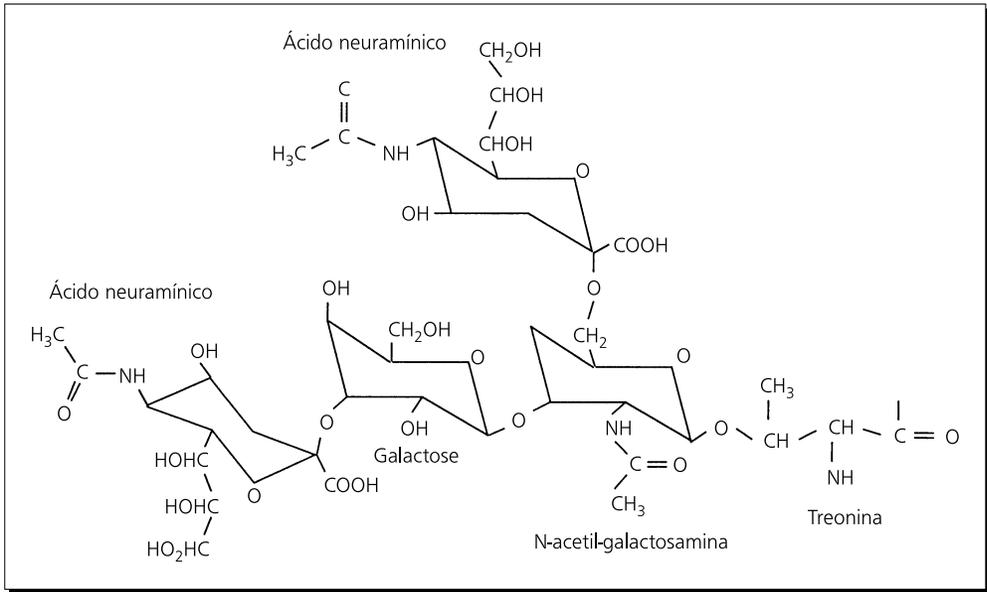


Figura 1.10 Oligossacarídeo da  $\kappa$ -caseína.

cionem estericamente para formar as estruturas secundárias típicas das proteínas ( $\alpha$ -hélice, lâminas  $\beta$ , etc.). Portanto, as caseínas, dada sua riqueza em prolina, caracterizam-se por possuir amplas zonas desorganizadas.

Os aminoácidos das caseínas também não estão uniformemente distribuídos; há zonas ricas em aminoácidos polares, enquanto, em outras, concentram-se os resíduos mais

apolares (Figura 1.11). Por conseguinte, há partes da molécula protéica de acentuado caráter hidrófilo, enquanto predomina a hidrofobicidade em outras zonas. Essa estrutura é característica de um dipolo ou de um detergente e permite às caseínas formar emulsões e espumas de estabilidade aceitável. A caseína em que mais predomina o caráter hidrófobo é a  $\beta$ , e a mais hidrófila é a  $\alpha_{s2}$ . A zona próxima à carboxila

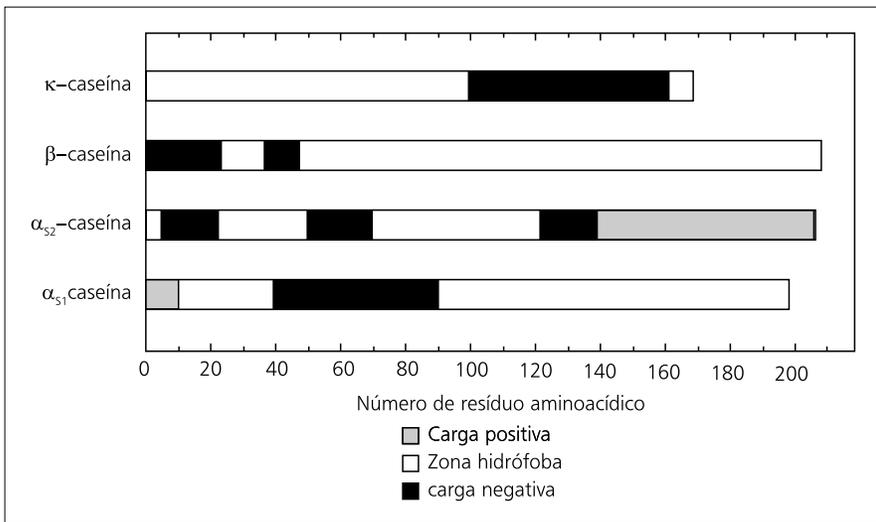


Figura 1.11 Representação esquemática da estrutura primária das caseínas.

terminal da  $\kappa$ -caseína é acentuadamente polar, sobretudo, quando contém o grupo glicosídico, enquanto o resto da molécula é bastante hidrofóbico. Essa estrutura é decisiva para a estabilidade da micela caseínica (ver mais adiante).

Os resíduos de serina esterificados com fosfatos também não estão homogeneamente distribuídos. Por exemplo, os 11 grupos fosfato de uma molécula de  $\alpha_{s2}$ -caseína estão contidos nos resíduos aminoacídicos 8, 9, 10, 16, 56, 57, 58, 61, 129, 131 e 143. Ou seja, estão agrupados em 3 zonas e, portanto, suas cargas negativas podem atrair com maior intensidade os cátions, especialmente o cálcio (ver mais adiante).

### Estrutura secundária e terciária das caseínas

Já se mencionou que a elevada quantidade de resíduos de prolina, peculiaridade dessas proteínas, faz com que o grau de estruturação dessas proteínas seja menor que o de outras. A menos organizada é a  $\beta$ -caseína. Nela, 70% de seus restos não formam estrutura secundária. Ao contrário, a  $\kappa$ -caseína, a mais estruturada, contém apenas quarta parte de seus aminoácidos desorganizados.

Essa desorganização tem conseqüências interessantes:

- São mais facilmente proteolisáveis do que as proteínas globulares em estado nativo. Ou seja, as caseínas são digeridas com mais facilidade, fator fundamental para o lactente. Também tem importância tecnológica, especialmente no queijo, já que os fenômenos proteolíticos que ocorrem durante sua maturação serão decisivos nas características sensoriais do produto acabado (Capítulo 5).
- A estrutura aberta, junto com a natureza dipolar das caseínas (Figura 1.11), faz com que tenham boa capacidade emulsificante e espumante.
- A estrutura aberta faz com que sejam resistentes a diversos agentes desnaturadores, especialmente ao calor. Pode-se assegurar de que o leite se esteriliza sem perder substancialmente seus atributos sensoriais, graças à desorganização inerente às caseínas.

### Micela

Já se disse que, no leite, as caseínas encontram-se sob a forma de dispersão coloidal, formando partículas de tamanho variável. Essas partículas que dispersam a luz e que, portanto, conferem ao leite sua cor branca característica, recebem o nome de micelas. Cerca de 95% das caseínas formam partículas coloidais, ficando as restantes molecularmente dispersas dentro do leite. A micela não é formada apenas por caseínas, mas, em termos de extrato seco, aproximadamente 7% são componentes de baixo peso molecular, e recebem o

nome de fosfato coloidal (esta fração em geral é conhecida com a sigla CCP, derivada das iniciais de *colloidal calcium phosphate*). Apesar de seu nome, o CCP é composto não apenas por fosfato cálcico, mas também por citrato, magnésio e outros elementos minerais. No microscópio eletrônico, as micelas são observadas como partículas esféricas com diâmetro entre 40 e mais de 300  $\mu\text{m}$ . O tamanho e o número de micelas estão inversamente relacionados; isto é, quanto menores são as micelas, maior é seu número. A micela é uma partícula muito hidratada; calcula-se que para cada grama de matéria seca pode haver cerca de 3 g de água.

### Propriedades das micelas

As micelas são estáveis:

- a) Nos tratamentos térmicos empregados para a esterilização e, evidentemente, para a pasteurização do leite. Essa afirmação é certa quando o pH do leite não sofreu mudanças (mantém-se próximo a 6,8) isto é, não se acidificou como conseqüência do crescimento microbiano. À medida que o pH diminui, o tratamento térmico necessário para desestabilizar o leite (coagulá-lo) é cada vez menos intenso; quando se chega ao pH 4,6 (ponto isoelétrico das caseínas), a coagulação já se observa à temperatura ambiente.
- b) Na compactação. Isto é, podem sedimentar-se por ultracentrifugação e depois ressuspender-se.
- c) Na homogeneização.
- d) Em concentrações de cálcio relativamente elevadas (até 200 mM a 50°C), embora as caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ , quando molecularmente dispersas, precipitem-se em presença de 4 mM de cálcio.

As micelas não são estáveis:

- a) Em pH ácido (já discutido).
- b) Muitas proteases são capazes de coagular o leite porque desestabilizam as micelas caseínicas. Essa propriedade é uma das bases da indústria de queijo. A adição de quimosina (enzima extraída do abomaso de ruminantes lactentes) ou de outras proteases provoca a cisão da molécula de  $\kappa$ -caseína em nível de ligação peptídica entre os resíduos aminoacídicos 105 (Met) e 106 (Phe) e, se houver cálcio livre no leite, forma-se um gel que recebe o nome de coalhada.
- c) No congelamento. À medida que o leite se congela, todos os solutos vão se concentrando na parte líquida e, por conseguinte, concentram-se o cálcio e as micelas. Quando a concentração de cálcio é excessiva, as micelas se desestabilizam.
- d) Em etanol a 40% a pH 6,7. A precipitação com etanol é obtida com concentrações menores com pH inferiores.



cie seja rica em  $\kappa$ -caseínas fiquem na superfície da micela, dada sua dificuldade de unir-se a outras sub-micelas pelo CCP, em função de pobreza em resíduos fosfato.

- b) A partícula coloidal ou micela, por sua vez, é formada de partículas menores, denominadas submicelas. Essa afirmação baseia-se em observações com o microscópio eletrônico. As submicelas têm peso molecular de alguns milhões e propriedades diferentes das da micela: não coagulam com quimosina nem com outras proteases, precipitam-se com concentrações menores de cálcio, etc. A forma de união de uma submicela a outras é pelo CCP e por ligações hidrofóbicas. Essa afirmação está bem demonstrada, pois se o CCP é obrigado a sair do interior da micela mediante vários tratamentos (diálise ou acidificação), a partícula coloidal desagrega-se em suas subunidades. A desagregação também é obtida com tratamentos que não afetam o CCP, mas sim as ligações hidrofóbicas, como o tratamento com uréia ou a alcalinização.
- c) A micela é porosa. Não forma estrutura compacta que impeça o transbordamento de moléculas de seu interior. Observou-se que as moléculas de  $\beta$ -caseína emigram do interior da micela para o espaço externo em condições de refrigeração, reincorporando-se à micela quando aumenta a temperatura. Também se observou que algumas carboxipeptidases podem chegar ao interior da micela e hidrolisar as caseínas mais internas.
- d) A micela está hidratada, retendo uma quantidade de água em torno de 3 g por grama de proteína.

Para resumir, pode-se dizer que as micelas são partículas coloidais hidratadas com diâmetro entre 40 e 300  $\mu\text{m}$ , de estrutura porosa, formadas por submicelas e, sua superfície é rica em  $\kappa$ -caseínas.

O modelo mais aceito atualmente pode ser visto na Figura 1.12. Observa-se a disposição periférica da  $\kappa$ -caseína, a estrutura submicélica e a forma de união de umas submicelas a outras pelo CCP. Nota-se também as pequenas saliências em forma de capa pilosa (zonas C-terminais da  $\kappa$ -caseína), que se sobressaem da superfície micelar. Essas formações explicariam a facilidade com que a quimosina e outras proteases chegam à ligação entre os resíduos 105 e 106 dessa proteína. Essas saliências protéicas também ajudam a compreender a capacidade de retenção de água da micela e sua estabilidade. Considera-se que:

- A porção de  $\kappa$ -caseína que sobressai da superfície micélica está carregada negativamente (nessa zona encontra-se o carboidrato, de acentuada eletronegatividade) e, portanto, é hidrófila.
- O acúmulo de cargas negativas na periferia da micela, que inclusive sobressaem da superfície da partícula coloidal, influi na estabilidade porque provoca certa repulsão entre

as micelas mais próximas, evitando choques entre elas e sua possível união, não apenas pelas cargas negativas, mas também por impedimento estérico; a união de micelas contíguas seria mais fácil se sua superfície fosse lisa.

### Proteínas do soro

Cerca de 20% do nitrogênio protéico do leite de vaca aparece em forma de proteínas do soro. Essas substâncias são solúveis a pH 4,6 e insolúveis em TCA a 12,5%. Por suas propriedades nutritivas e funcionais, é comum a indústria alimentícia extrair essas proteínas do leite e, com mais frequência, do soro, resultante do processamento de queijos ou manteigas. Os sistemas de obtenção são diversos e a escolha de um deles baseia-se na matéria-prima disponível e do grau de pureza desejado. Os métodos de separação de caseínas e proteínas do soro (precipitação ácida, coagulação enzimática, centrifugação, etc.) podem ser empregados para a obtenção destas últimas. Nesses casos, é comum eliminar impurezas (lactose, sais minerais, etc.), isto é, purificar a fração protéica resultante se a intenção é obter um produto de alta qualidade. A purificação pode ser feita mediante diversas técnicas, como ultrafiltração, eletrodialise, etc. (Capítulo 6).

Como já se mostrou na Tabela 1.6, as proteínas do soro mais abundantes no leite de vaca são  $\beta$ -lactoglobulina (9,5% do nitrogênio total do leite), a  $\alpha$ -lactoalbumina (3,5%), as imunoglobulinas (2%) e a soroalbumina bovina (1%). Além destas, há mais uma centena de espécies protéicas distintas, sempre em quantidades muito pequenas. Em seguida, serão estudadas brevemente as proteínas mais interessantes do ponto de vista científico e tecnológico.

### $\beta$ -lactoglobulina

Seu peso molecular é de 18.000. Esta proteína representa 50% das proteínas do soro do leite de vaca, enquanto o leite de mulher carece dela. Contém 5 resíduos de cisteína, formando duas pontes dissulfeto que proporcionam sua forma globular. Portanto, fica livre um resto cisteínico com um grupo  $-\text{SH}$  livre capaz de reagir com outros.

Não se conhece com exatidão a função biológica dessa proteína. Alguns autores afirmam que ela age como transportador de vitamina A. Essa vitamina unir-se-ia mediante ligações hidrofóbicas nas zonas mais internas da estrutura globular da proteína, e assim ficaria protegida, podendo atravessar incólume as primeiras zonas do trato digestivo até chegar onde pudesse ser assimilada.

### $\alpha$ -lactoalbumina

Representa 20% das proteínas do soro do leite bovino, enquanto no leite humano, é a proteína mais abundante. Seu peso molecular é de cerca de 16.000. Sua função biológica é

perfeitamente conhecida, fazendo parte do sistema enzimático responsável pela síntese da lactose.



Essa reação é catalisada pela lactose sintetase, composta de duas proteínas. A parte A, uma galactosil transferase inespecífica, e a parte B (a  $\alpha$ -lactoalbumina), que torna específica a parte A, fazendo com que se transfiram exclusivamente galactoses a moléculas de glicose. É sensível a relação existente entre a concentração dessa proteína e a da lactose no leite; ou seja, em leites muito ricos em  $\alpha$ -lactoalbumina encontra-se sempre elevada proporção de lactose (p. ex., no leite humano).

A  $\alpha$ -lactoalbumina é uma metaloproteína que liga um átomo de cálcio por molécula. Esse elemento confere-lhe certa estabilidade térmica, sendo, de fato, a soroproteína menos termolábil.

## Soroalbumina bovina

Esta proteína procede do sangue. Sua concentração costuma oscilar entre 0,1 e 0,4 g/L de leite. Não se conhece exatamente sua função, mas assinalou-se que ela pode unir-se a ácidos graxos e estimular as atividades lipásicas.

## Imunoglobulinas

Até 10% do colostro (em peso úmido) pode ser formado por estas proteínas. No leite, podem atingir concentrações de 0,6 a 1,0 g/L. As imunoglobulinas presentes no leite são a IgA, a IgG e a IgM.

## Outras proteínas do soro

Como já dissemos, há muitas outras proteínas — mais de cem — consideradas proteínas do soro. Pode-se destacar cerca de 60 enzimas identificadas (lipases, proteases, fosfatases, lactoperoxidasas, etc.) (ver “Enzimas”, neste capítulo), proteínas da membrana do glóbulo de gordura, lactoferrina, que quela ferro, atuando como transportadora desse elemento e tornando-o assimilável para o lactente, ceruloplasmina (quela cobre), proteínas ligantes de folato e vitamina B<sub>12</sub>.

## Desnaturação térmica das soroproteínas do leite

As caseínas são muito estáveis termicamente e suportam bem as condições de esterilização. Ao contrário, as proteínas do soro são mais ou menos termolábeis. Podem ser ordenadas da maior à menor estabilidade:  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lacto-

globulina, soroalbumina bovina, imunoglobulinas. A  $\alpha$ -lactoalbumina, inclusive, se desnatura praticamente em sua totalidade após tratamento de 30 minutos a 90°C. Apenas a  $\beta$ -lactoglobulina foi estudada em profundidade a esse respeito por ser a soroproteína majoritária no leite de vaca e pelas conseqüências tecnológicas que decorrem de sua desnaturação. Ao ser tratada termicamente uma solução de  $\beta$ -lactoglobulina, as moléculas começam a soltar-se ao se atingir 65°C, ocasião em que se rompem suas ligações dissulfeto. A presença de grupos SH livres permite a formação de novas ligações, isto é, formam-se polímeros de tamanho pequeno. À medida que a temperatura continua aumentando, os pequenos polímeros formados podem reagir uns com os outros de forma inespecífica, provavelmente mediante ligações hidrofóbicas, formando grandes agregados que dão turbidez à solução ou, se esta for suficientemente concentrada, um gel. Se é o leite que sofre o tratamento térmico, a desnaturação ocorre da mesma forma, mas, nesse caso, a  $\beta$ -lactoglobulina deposita-se sobre a micela, ancorando-se firmemente mediante ligações dissulfeto com os restos -SH livres da  $\kappa$ -caseína. Como conseqüência disso, modificam-se as propriedades da micela, dificultando-se a coagulação por quimosina e formando-se uma coalhada mais mole. Ao mesmo tempo, dificulta-se a geleificação do leite durante sua concentração (Capítulo 3). Não se sabe com exatidão se outras proteínas do soro podem formar esse mesmo tipo de ligação, depositar-se sobre a superfície micélica e modificar igualmente as propriedades do leite.

## SAIS

Sob a epígrafe *sais* serão englobados compostos não-ionizados e os que se encontram ou podem encontrar-se sob a forma de íons de baixo peso molecular no leite. Portanto, a referência não é apenas a sais minerais ou inorgânicos, mas incluem-se também alguns compostos orgânicos.

Os componentes majoritários são fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Há outros elementos em quantidades menores, como cobre, ferro, boro, manganês, zinco, iodo, etc. O conteúdo total em sais é bastante constante: em torno de 0,7 a 0,8% do leite em peso úmido. Acrescentando-se a essa quantidade os pouco menos de 0,2 g/100 mL de sais orgânicos, resulta que cerca de 1% do leite seja constituído de sais.

Na Tabela 1.9, apresenta-se a composição salina do leite. Os elementos mais abundantes são potássio, cálcio, cloro, fósforo e citratos. As cifras indicadas são valores aproximados e não correspondem a uma determinada espécie ou a um momento de lactação concreto, etc.; por isso, talvez se encontrem algumas diferenças ao compará-las com as de outros textos.

**Tabela 1.9** Composição média de sais (mg/100 mL) do leite de vaca

Sódio	50
Potássio	145
Cálcio	120
Magnésio	13
Fósforo	95
Cloro	100
Sulfatos	10
Carbonato (como CO <sub>2</sub> )	20
Citrato	175

Os sais do leite podem ser encontrados em solução ou em estado coloidal.

### Distribuição dos sais entre as fases solúvel e coloidal

Na Tabela 1.10, apresenta-se a distribuição aproximada dos sais entre as fases solúvel e coloidal. Os únicos elementos que nunca são encontrados na fase coloidal são os ânions de ácidos fortes (cloreto e sulfato). Os demais, em proporções mais ou menos elevadas, estão distribuídos entre as duas fases. Os elementos mais abundantes na fase coloidal são o cálcio e o fósforo.

Os sais em estado solúvel são encontrados como íons livres e fazendo parte de complexos iônicos ou de complexos sem ionizar. No pH normal do leite, sempre se encontram na fase solúvel os íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, enquanto os sais dos ácidos fracos (fosfatos, citratos e carbonatos) estão distribuídos em várias formas iônicas. A concentração de cada uma delas depende fundamentalmente do pH do leite. Conhecendo esse pH e os pK dos equilíbrios que se estabelecem entre as diversas formas iônicas (Tabela 1.11), pode-se determinar aproximadamente a concentração relativa de cada íon, aplicando a equação de Henderson-Hasselback:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \left( \frac{[\text{sal}]}{[\text{ácido}]} \right) \quad (1.1)$$

As formas iônicas existentes no leite de pH normal, no que se refere aos fosfatos, são H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (60%) e HPO<sub>4</sub><sup>=</sup> (40%). Para cada 16 moléculas de íon tricitrato, haverá uma de dicitrato. Os poucos carbonatos presentes aparecem em forma de bicarbonato. Além desses íons, também podem-se encontrar na fase solúvel complexos iônicos como CaPO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CaCitr<sup>-</sup> ou CaHCO<sub>3</sub><sup>+</sup>, e complexos não-iônicos que não se dissociam (p. ex., CaHPO<sub>4</sub>, MgHPO<sub>4</sub>).

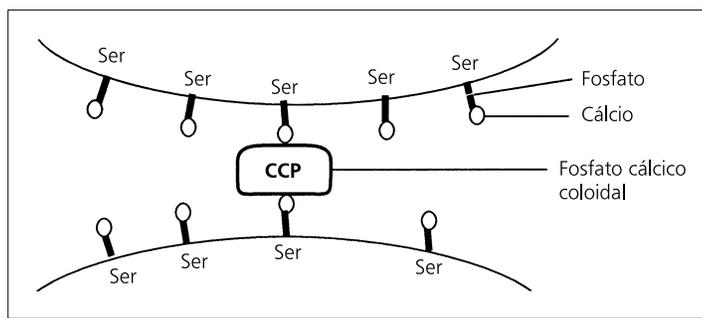
**Tabela 1.10** Distribuição aproximada dos sais entre as fases solúvel e coloidal do leite fresco (pH = 6,8) de vaca (mg/100 mL)

	Total	Fase solúvel	Fase coloidal
Sódio	50	46 (92%)	4 (8%)
Potássio	145	133 (92%)	12 (8%)
Cálcio ionizado	120	40 (33%) 12 (100%)	80 (67%)
Magnésio	13	9 (67%)	4 (33%)
Fósforo	95	41 (43%)	54 (57%)
Cloro	100	100 (100%)	
Sulfatos	10	10 (100%)	
Citrato	175	164 (94%)	11(6%)

Na Tabela 1.10, observa-se que cerca de dois terços do cálcio e um pouco mais da metade do fósforo do leite encontram-se em suspensão coloidal, formando parte da micela caseínica. Como já dissemos, o conjunto dos elementos minerais que fazem parte da micela é denominado CCP (ver Micela). Essa denominação pode induzir ao erro, pois parece indicar que o único componente mineral da micela é o fosfato cálcico, quando, de fato, embora esse composto seja majoritário, há também sódio, magnésio, potássio, citratos e outros elementos. O papel do CCP na micela é manter as submicelas unidas umas às outras. Postularam-se diversos mecanismos de união. A teoria mais aceita é a de que os restos seril-fosfato da cadeia protéica na periferia de uma submicela unem-se a um átomo de cálcio e este, por sua vez, fica unido ao CCP; o CCP se uniria a outra molécula de cálcio que estaria unida a outro fosfato de outra submicela. Ou seja, o CCP atuaria como ponte entre submicelas (ver Fi-

**Tabela 1.11** pK dos equilíbrios entre as formas iônicas dos fosfatos, citratos e carbonatos

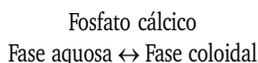
Ácido	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>
Cítrico	3,08	4,74	5,40
Fosfórico	1,96	6,83	12,32
Carbônico	6,37	10,25	



**Figura 1.13** Representação esquemática da união de duas submicelas pelo fosfato cálcico coloidal (CCP).

gura 1.13). Não se conhece com certeza a estrutura do CCP. Dos diversos modelos propostos, podem ser destacadas as estruturas em forma de apatita [ $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaHCitrato}^-$  ou  $2,5\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{CaHPO}_4\cdot 0,5\text{Ca}_3\text{Citrat}_2^-$ ], de hexafofosfato de nonacálcio [ $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ ] e de brusita [ $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ].

A concentração do fosfato cálcico no leite é consideravelmente maior na solubilidade desses sais, encontrando-se em sobressaturação na fase aquosa do leite. O excesso encontra-se em estado coloidal na micela de caseína. Há um equilíbrio, denominado equilíbrio salino do leite, entre os fosfatos cálcicos em fase aquosa e em fase coloidal:



Diversos fatores perturbam esse equilíbrio, trazendo conseqüências de grande interesse tecnológico:

- pH. A acidificação aumenta a solubilidade do fosfato cálcico. À medida que diminui o pH, o CCP vai se solubilizando, de tal forma que, em pH menor do que 4,9, praticamente todo o CCP já estará em fase aquosa. Nisso reside o fundamento da desestabilização micélica, como conseqüência da acidificação. A alcalinização tem efeito inverso.
- Adição de sais ao leite (a legislação permite a adição de citratos e fosfatos de sódio e potássio, entre outras substâncias, ao leite esterilizado, evaporado, etc., como amortecedores do pH):
  - Cátions divalentes. A adição de cálcio provoca aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  na fase aquosa; logo se forma fosfato cálcico, que passa a fazer parte da micela (recorde-se que o fosfato cálcico estava em sobressaturação antes da adição do cálcio) em forma de CCP, diminuindo a concentração de íons fos-

fato (tanto o di como o monovalente) na fase aquosa. Como conseqüência, o pH diminui.

- Fosfatos. A adição de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou  $\text{k}_2\text{HPO}_4$  provoca a formação de CCP e a conseqüente diminuição da concentração de cálcio iônico em fase solúvel. Nesse caso, se a quantidade de fosfato adicionada não for elevada demais e a micela admitir todo o fosfato cálcico formado, o pH não tem por que mudar. Se, ao contrário, acrescentam-se polifosfatos (p. ex., hexametáfosfato sódico) ao leite, estes quelam o cálcio, portanto, diminui a concentração de fosfato cálcico em fase aquosa, e permite-se a solubilização de CCP. Conseqüentemente, aumenta a concentração de fosfato iônico na fase aquosa e o pH aumenta.
- Citratos. Ocorre praticamente o mesmo que no caso anterior. Os citratos reagem avidamente com o cálcio e, por isso, diminuem as concentrações de cálcio iônico e a de fosfato cálcico na fase aquosa, e dissolve-se o CCP. Também ocorre aumento do pH.
- Temperatura. A solubilidade do fosfato cálcico é muito dependente da temperatura. Diferentemente da grande maioria das substâncias, o fosfato cálcico é menos solúvel à medida que a temperatura aumenta. Por conseqüente, quando o leite esfria, parte do CCP se dissolve e passa à fase aquosa; com isso, aumenta a concentração de fosfatos em forma iônica, e o pH aumenta ligeiramente. O processo inverso, isto é, o aquecimento (pasteurização, esterilização) provoca o efeito contrário: insolubilização dos fosfatos cálcicos e diminuição do pH, que pode ter conseqüências práticas importantes; se à redução do pH própria do tratamento térmico associa-se acidez significativa da matéria-prima, as micelas podem desestabilizar-se e o leite coagular durante o processo de esterilização. Por isso, o

controle do pH ou da acidez antes dos tratamentos térmicos é um aspecto essencial.

- Concentração. Como já foi dito, a fase aquosa do leite está sobressaturada de fosfato cálcico. É evidente que ao se concentrar o leite (processo realizado na obtenção de leite concentrado, evaporado, condensado e em pó), parte do fosfato cálcico passará à micela em forma de CCP, o que implica perda de fosfato em forma iônica e, conseqüentemente, o pH diminuirá. Também é evidente que a diluição do leite terá o efeito contrário, alcalinizando-se ligeiramente.

## Oligoelementos

Além dos componentes estudados até agora, o leite pode conter grande quantidade de elementos minerais em concentrações traço. Desses, alguns podem ser considerados como inerentes ao leite (zinco, ferro, cobre, manganês, etc.) e outros procedentes de contaminação (chumbo cádmio, mercúrio, etc.). As concentrações que podem atingir são: zinco (3 a 6 ppm), silício (1 a 6 ppm), iodo (0,01 a 0,3 ppm), bromo (~0,15 ppm), flúor (~0,15 ppm), manganês (0,01 a 0,03 ppm), selênio (0,01 a 0,03 ppm) e quantidades ainda menores de cromo, alumínio, molibdênio, etc. O ferro e o cobre merecem menção à parte, dado seu caráter prooxidante e a concentração que podem atingir em alguns produtos lácteos. Demonstrou-se que sua concentração no leite depende do sistema de coleta. Se ela fosse feita em vidro, a concentração desses metais seria consideravelmente menor do que a que se obtém com o sistema de coleta tradicional. A quantidade de ferro diminuiria de 1,5 a 2,4 para 0,6 a 1,2 ppm e a de cobre, de 0,2 a 0,8 para 0,2 a 0,4 ppm.

## ENZIMAS

No leite de vaca, foram detectadas cerca de 60 enzimas diferentes cuja origem é difícil determinar. Em termos gerais, pode-se dizer que algumas procedem das células do tecido mamário, outras do plasma sanguíneo e outras, ainda, dos leucócitos do sangue. As enzimas são encontradas em baixas concentrações, mas sua atividade é tal que, por serem catalisadores bioquímicos, podem provocar importantes mudanças, inclusive em baixa concentração.

A importância do estudo das enzimas do leite se deve a diversas razões:

- Algumas são agentes que provocam a hidrólise dos componentes do leite (proteases, lipases, etc.)
- A sensibilidade ao calor de algumas delas é utilizada para controlar tratamentos térmicos (fosfatase alcalina e lactoperoxidase).

- Sua origem serve como índice de contaminação microbiana (superóxido dismutase)
- Sua atividade bactericida pode inibir o crescimento microbiano (sistema lacto-peroxidase-tiocianato).
- Sua função biológica (lactose sintetase).

As enzimas do leite podem ser classificadas nos seguintes grupos:

## Hidrolases

As principais enzimas desse grupo são:

### Lipases

A principal enzima lipolítica da gordura é a *lipase* do leite; trata-se de uma glicoproteína (cujo peso molecular é de 62.000 a 66.000), que atinge sua maior atividade com pH de 7 a 8, embora seu intervalo de atuação seja bastante amplo; pode hidrolisar triglicerídeos de cadeia curta e longa, fosfolípidos, monoglicerídeos e ésteres sintéticos. É termolábil, pois perde sua atividade a temperaturas de pasteurização. No item "Principais alterações que afetam os lípidos", temos mais detalhes sobre essa enzima.

### Proteases

A atividade proteolítica endógena do leite é representada por um sistema enzimático constituído por duas proteases diferentes: uma alcalina e outra ácida.

A *protease alcalina* ou *plasmina* é uma enzima de 48.000 dáltons e pH ótimo de atuação de 8. É uma proteína de atividade semelhante à tripsina e está associada às micelas da caseína. Sua atividade recai fundamentalmente sobre as caseínas  $\beta$  e  $\alpha_{s2}$  embora também se mostre ativa em face das caseínas  $\kappa$  e  $\alpha_{s1}$ . A ação da plasmina pode causar graves defeitos nos produtos lácteos submetidos a tratamento UHT (sabor amargo e mudanças na viscosidade). A hidrólise que provoca na  $\beta$ -caseína dá origem às  $\gamma$ -caseínas.

A *protease ácida* apresenta ótima atuação em pH 4. Seu peso molecular é de 36.000, sendo mais termolábil que a protease alcalina. Sua ação está centrada preferencialmente na  $\alpha_{s1}$  caseína, gerando  $\lambda$ -caseínas.

### Fosfatases

Esse grupo de enzimas hidrolisa os ésteres do ácido fosfórico. Foram identificadas duas fosfatases: alcalina e ácida.

A *fosfatase alcalina* está localizada majoritariamente na camada externa da membrana do glóbulo de gordura. É uma glicoproteína constituída por duas subunidades de 85.000 dál-

tons. Apresenta resistência aos tratamentos térmicos ligeiramente superior à da *Mycobacterium tuberculosis*, considerada, tradicionalmente, como a bactéria mais termorresistente entre as normalmente encontradas no leite. A destruição da enzima assegura o desaparecimento dos patógenos e a salubridade do leite; por isso, sua inativação é utilizada para controlar o processo de pasteurização. Entretanto, dada a importância da inativação térmica dessa enzima, é preciso levar em conta que depois de algum tempo de armazenamento observa-se uma reativação, provavelmente devido à reorganização interna da molécula parcialmente modificada durante o aquecimento.

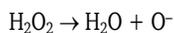
A *fosfatase ácida* apresenta-se em concentração inferior à alcalina. Seu pH ótimo é de 4,5 e também está associada à membrana do glóbulo de gordura. Seu interesse tecnológico é bem menor do que o da alcalina.

## Oxidases

As principais enzimas desse grupo são:

### Lactoperoxidase

É uma glicoproteína (77.500 dáltons) com grupo um prostético *heme*, o que lhe confere a capacidade de catalisar as reações oxidantes dos ácidos graxos. Essa enzima transfere  $O_2$  dos  $H_2O_2$  a outros substratos:



Aparece associada às proteínas do soro do leite. A lactoperoxidase é mais resistente ao calor (80°C) que a fosfatase alcalina e, por isso, é utilizada também para controlar a pasteurização.

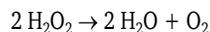
Contudo, a importância fisiológica e tecnológica da lactoperoxidase está em sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Assim, em presença de  $H_2O_2$  e tiocianato ( $SCN^-$ ), a lactoperoxidase catalisa a oxidação do tiocianato (sistema lactoperoxidase-tiocianato), produzindo substâncias ( $OSCN^-$ ,  $O_2SCN^-$ ,  $O_3SCN^-$ ) que inibem a síntese de carboidratos e aminoácidos e, conseqüentemente, de proteínas, ADN e ARN, inibindo assim o crescimento microbiano.

### Xantina oxidase (redutase de Scharidinger)

É uma flavoproteína (275.000 dáltons) que se apresenta associada à membrana do glóbulo de gordura. Catalisa a oxidação da xantina, da hipoxantina, de aldeídos e de NADH. Durante esse processo, produz-se  $H_2O_2$ , que pode ser utilizado no sistema lactoperoxidase-tiocianato.

## Catalase

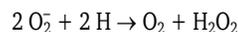
Esta enzima possui um grupo *heme* (250.000 dáltons), que pode potencializar a oxidação dos ácidos graxos insaturados. Está associada às partículas lipoprotéicas da membrana do glóbulo de gordura. A catalase catalisa a reação:



A determinação da catalase é um indicador indireto da qualidade higiênica do leite, visto que nos leites de vacas com mastite e no colostro é encontrada em quantidades superiores do que as do leite normal.

## Superóxido dismutase

É uma metaloproteína (16.000 dáltons) constituída por duas subunidades que contêm, cada uma, um Cu e um Zn por mol. Catalisa a dismutação do ânion superóxido:



Esse ânion permite a formação de compostos oxidantes, como o oxigênio singlete e radicais hidroxila, que podem causar a oxidação dos lipídeos, a destruição das membranas biológicas e a degradação das macromoléculas.

## Sulfidriloxidase

Esta enzima é constituída por várias subunidades, com peso molecular de 89.000. Sua principal missão é catalisar a formação de pontes dissulfeto a partir dos grupos sulfidril livres.

## Transferases

A transferase do leite que mais se destaca é a lactose sintetase, uma galactosiltransferase que catalisa a biossíntese da lactose (ver itens “Lactose” e “Proteínas do leite”, neste capítulo).

## VITAMINAS

No leite, estão presentes todas as vitaminas. As lipossolúveis (A, D, E) aparecem associadas ao componente graxo do leite e perdem-se com a eliminação de gordura. As vitaminas hidrossolúveis podem ser isoladas a partir do soro do leite; por isso, seu conteúdo reduz-se drasticamente no processo de elaboração dos queijos.

Na Tabela 1.12, apresenta-se o conteúdo em vitaminas dos leites humano e bovino. Pode-se dizer que o leite é uma excelente fonte de riboflavina, de vitamina  $B_{12}$ , de tiamina e

**Tabela 1.12** Vitaminas dos leites bovino e humano

Vitamina	Conteúdo (mg/litro)		IDR (mg/dia)	
	Bovino	Humano	Lactentes	Adultos
Vitamina A	0,4	0,6	0,4*	1*
Caroteno	0,2	0,4		
Vitamina D	0,0006	0,0006	0,01	0,05
Vitamina E	0,98	6,64	3	10
Tiamina	0,44	0,16	0,3	1,4
Riboflavina	1,75	0,36	0,4	0,6
Niacina	0,94	1,47	6	18
Ácido pantotênico	3,46	1,84	2	
Piridoxina	0,64	0,1	0,3	2,2
Biotina	0,031	0,008	0,035	
Ácido fólico	0,05	0,05	0,03	0,4
Cianocobalamina	0,0043	0,0003	0,0005	0,003
Vitamina C	21,2	43	35	60
Colina	121	90		
Mio-inositol	50	330		

IDR: Ingestão diária recomendada.

\*Equivalentes de retinol, 1 µg retinol = 6 µg de β-caroteno.

de vitamina A. A vitamina D e o ácido fólico aparecem em quantidades pequenas. Embora normalmente o leite não seja considerado boa fonte de vitamina C, com o processamento adequado talvez se possa reter o suficiente dessa vitamina para que sua concentração no leite proporcione quantidade significativa dela à dieta.

Na Tabela 1.13, apresenta-se a perda aproximada de algumas vitaminas com os tratamentos térmicos aplicados ao leite. Os mais intensos, como a esterilização hidrostática ou a desidratação, provocam perdas significativas de muitas vita-

minas, sobretudo da B<sub>12</sub>, da qual o leite é uma fonte importante.

A significativa contribuição das vitaminas ao valor nutritivo do leite (Tabela 1.14), o conhecimento das causas de sua degradação e o uso de métodos para reduzir ao mínimo as perdas (processamento a alta temperatura e tempo curto ou a exclusão do oxigênio e da luz durante o armazenamento) devem permitir que, no futuro, sejam obtidos produtos lácteos estáveis, seguros e quase inalterados em relação aos nutrientes originais.

**Tabela 1.13** Perda aproximada (%) de algumas vitaminas após o tratamento térmico do leite

Processo	Tiamina	Riboflavina (1)	Piridoxina	Cianocobalamina (2)	Ácido ascórbico (3)
Pasteurização HTST (4)	10	0	0	0	25
Pasteurização + Ebulição (5)	10	10	10	5	30-70
Esterilização:					
Hidrostática (6)	40	0	50	80-100	60
UHT direto	10	0	10	5	30
UHT indireto	10	0	10	5	30 (7)
Leite evaporado (6)	50	0	60	80-100	80
Leite condensado (8)	20	0	10	30	30
Leite em pó (9)	10	0	10	15	40

(1) Esta vitamina é fotolábil. A exposição à luz causa perdas. É importante o tipo de embalagem. (2) Pode-se perder até 20% durante o armazenamento prolongado. (3) Pode-se perder em sua totalidade em armazenamento prolongado. (4) Considera-se que possui a mesma riqueza que o leite cru, exceto em vitamina C. (5) Se, além disso, é fervido sem agitação, perde-se de 10 a 15% do cálcio (deposita-se no fundo do recipiente). (6) Ocorrem ainda outros fenômenos, como o escurecimento não-enzimático. (7) A perda durante o armazenamento é mais rápida por esse procedimento, pois a eliminação do ar não pode ser feita de modo eficaz. (8) Tem alto valor energético pelo açúcar adicionado. (9) Quando se utiliza o método dos cilindros, as reações de escurecimento não-enzimático são muito intensas.

**Tabela 1.14** Ingestão diária recomendada e porcentagem aproximada de proteínas, vitaminas e minerais proporcionados por 500 mL de leite

	Crianças		Adultos	
	IDR	% aporte	IDR	% aporte
Proteínas (mg)	30	37	56	23
Vitamina A (µg RE)	500	47	1.000	47
Vitamina D (µg)	10	1	5	
Vitamina C (mg)	450	14	60	8
Tiamina (mg)	0,9	32	1,4	15
Riboflavina (mg)	1	100	1,6	43
Cianocobalamina (mg)	2,5	100	3	
Ca (mg)	800	100	800	75
P (mg)	800	60	800	48
Fe (mg)	10	2,5	10	1,6

IDR: Ingestão diária recomendada. RE: retinol. Crianças: 5 a 7 anos. Adultos: 25 a 30 anos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIS, C.H. (1985): *Ciencia de la leche*. Reverté. Barcelona.

FOX, P.F. (1992): *Advances in Dairy Chemistry: Proteins*, vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers. Londres.

FOX, P.F. (1994): *Advances in Dairy Chemistry: Lipids*, vol. 2. Elsevier Applied Science Publishers. Londres.

FOX, P.F. (1996): *Advances in Dairy Chemistry: Lactose, water, salts and minor constituents*, vol. 3. Elsevier Applied Science Publishers. Londres.

PADLEY, F. B.; GUNSTONE, F. D. y HARWOOD, J. L. (1992): *The lipid handbook*. Chapman & Hall. Londres.

SCHMIDT, G. H. (1974): *Biología de la Lactación*. Acribia. Zaragoza.

WALSTRA, P. y JENNESS, R. (1986): *Química y física lactológica*. Acribia. Zaragoza.



## RESUMO

- 1 O leite é uma mistura de substâncias das quais algumas encontram-se em emulsão (gordura), outras em suspensão (caseínas e alguns sais) e o restante em solução (lactose, proteínas do soro, sais, etc.)
- 2 A lactose é um dissacarídeo fermentável, de reduzido poder edulcorante, pouco solúvel em água, que pode cristalizar em alguns produtos lácteos. Em determinadas ocasiões, essa cristalização é desejável para a elaboração de determinados produtos, mas deve ser controlada para que se produza na forma adequada. A lactose é o substrato que as bactérias lácticas utilizam durante a fabricação de leites fermentados e queijos.
- 3 A gordura do leite aparece formando glóbulos, compostos por uma membrana lipoprotéica externa e em cujo interior há, fundamentalmente, triglicerídeos. Para evitar a separação da gordura, recorre-se à homogeneização, processo que diminui o tamanho dos glóbulos. O conhecimento das propriedades físicas da gordura é de grande importância para poder conferir a alguns produtos lácteos, como sorvetes e manteigas, sua estrutura característica.
- 4 As proteínas do leite são classificadas em solúveis a pH 4,6 (proteínas do soro) e insolúveis (caseínas). Entre as primeiras, as mais importantes no leite de vaca são o  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina, que se caracterizam, entre outras propriedades, por sua termolabilidade. Por outro lado, as caseínas são muito termorresistentes, tolerando tratamentos esterilizantes sem que se produzam mudanças estruturais e sensoriais muito evidentes. Algumas modificações em sua estrutura (por acidificação ou tratamentos com determinadas proteases) podem induzir à formação de gel, o que constitui o fundamento da fabricação de iogurte e queijo.
- 5 Os sais majoritários do leite são fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos e carbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. A maior parte deles está distribuída entre as fases aquosa e coloidal do leite, com um sutil equilíbrio entre ambas. Qualquer mudança no leite (acidificação, tratamentos térmicos, adição de determinadas substâncias, etc.) pode modificar o equilíbrio e induzir mudanças nas propriedades do leite.
- 6 Existem mais de 60 enzimas no leite. As que mais se destacam são hidrolases, como lipases, proteases e fosfatases (a alcalina é utilizada para controlar a pasteurização do leite), oxidases (lactoperoxidase, xantina, oxidase, catalases, superóxido dismutase, sulfidriloxidase) e transferases, como responsáveis pela síntese da lactose.
- 7 No leite encontram-se todas as vitaminas e muitos minerais. Esse alimento é uma excelente fonte de cálcio, riboflavina, vitamina B<sub>12</sub>, tiamina e vitamina A, mas é deficitário, sobretudo, em vitamina D, folatos e ferro.