

NAAMAN FRANCISCO NOGUEIRA SILVA

**DEFOSFORILAÇÃO DE CASEÍNAS POR VIA ENZIMÁTICA E
QUÍMICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586d
2010

Silva, Naaman Francisco Nogueira, 1986-
Defosforilação de caseínas por via enzimática e química /
Naaman Francisco Nogueira Silva. – Viçosa, MG, 2010.
xv, 68f. : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 57-68.

1. Leite. 2. Caseína. 3. Bioquímica. 4. Fosfatase alcalina.
5. Fosfatase ácida. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

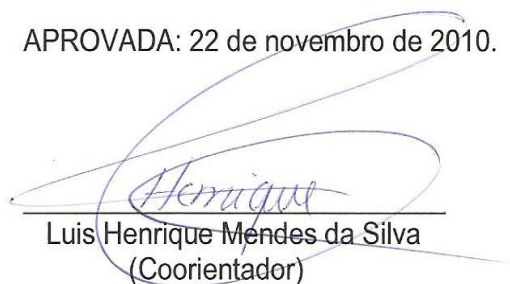
CDD 22.ed. 637.1

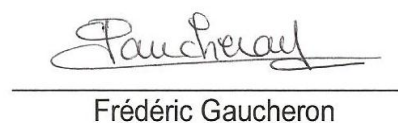
NAAMAN FRANCISCO NOGUEIRA SILVA

DEFOSFORILAÇÃO DE CASEÍNAS POR VIA ENZIMÁTICA E QUÍMICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de novembro de 2010.


Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)


Frédéric Gaucheron


Ana Clarissa dos Santos Pires


Eduardo Basílio de Oliveira


Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

*Se o que você quer em sua vida é só paz
Muitas doçuras, seu nome em cartaz
E fica arretado se o açúcar demora
E você chora, cê reza, cê pede... implora...
Enquanto eu provo sempre o vinagre e o vinho
Eu quero é ter tentação no caminho
Pois o homem é o exercício que faz
(Raul Seixas)*

Dedico:

Aos meus pais Chumbinho e Celina

Pelo amor, doação e alegria de viver

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Miste de Recherche Science et Technologie du Lait e du L'Oeuf (UMR - STLO) e à equipe Plateforme, pela oportunidade de executar meu experimento de mestrado.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho pela orientação, amizade e confiança e também por ter aberto as portas de um novo mundo, do qual estou honrado em integrá-lo.

Ao pesquisador e co-orientador Frédéric Gaucheron pelos sábios conselhos, pelas muitas horas de enriquecedoras discussões, pela confiança e pelo constante apoio durante a realização de meus experimentos.

Aos co-orientadores Ana Clarissa dos Santos Pires, Frédéric Gaucheron e Luiz Henrique Mendes da Silva, pelos conselhos indispensáveis à concretização do trabalho.

Aos professores Antônio Fernandes de Carvalho, José Benício Paes Chaves, Juraci Alves de Oliveira, Luiz Henrique Mendes da Silva, Maria Cristina Dantas Vanetti, pelo compartilhamento do saber humano e científico.

Ao pessoal do INRA – STLO pela simpatia, pelos bons momentos e pela ajuda imprescindível na execução deste trabalho, em especial Daniel Mollé, Eric Beaucher, Michel Piot, Florence Rousseau, Laurence Fauvel, Viviane Picard, Paulete Amet, Jéssica Musset e Benoit Robert.

À Samira pelo companheirismo sem igual.

À Michele pour la sympathie toujours contagieuse.

Aos amigos dos mais diferentes lugares, que mesmo longe jamais serão esquecidos (Cobraiada, habitantes de la Goute Pendante, Laticínios 2005, 1512...).

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa de Leite e Derivados.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

Aos baixinhos lá de casa, Pai, Mãe, Jesquinha e Hugo pelo amor, compreensão e apoio incondicionais.

BIOGRAFIA

NAAMAN FRANCISCO NOGUEIRA SILVA, filho de Joaquim Francisco da Silva e Maria Celina Nogueira da Silva, nasceu em Barbacena, Minas Gerais, em 11 de junho de 1986.

Em março de 2005 iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em janeiro de 2009.

Em março do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, em nível de Mestrado.

Índice

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	2
2.1 Leite.....	2
2.2 Caseínas.....	3
2.3 Minerais.....	7
2.3.1 Fosfato de cálcio.....	9
2.4 Micelas de Caseína.....	10
2.4.1 Características gerais.....	10
2.4.2 κ -caseína e seu papel estabilizador da micela.....	12
2.4.3 Organização estrutural e modelos.....	13
2.5 Modificações enzimáticas.....	16
2.6 Micela de caseína – uma estrutura dinâmica.....	18
Material e Métodos.....	21
3.1 Defosforilação.....	22
3.1.1 Defosforilação por via enzimática.....	22
3.1.1.1 Defosforilação de caseinato de sódio e caseinato de cálcio.....	22
3.1.1.2 Defosforilação em leite esterilizado (UHT) desnatado.....	24
3.1.2 Defosforilação por acidificação.....	26
3.2 Análises.....	28
3.2.1 Características físico-químicas e bioquímicas.....	28
3.2.1.1 pH.....	28
3.2.1.2 Concentração de Fósforo.....	29
3.2.1.3 Concentração de cálcio.....	29
3.2.1.4 Nitrogênio total (NT).....	29
3.2.1.5 Nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não protéico (NPN).....	30
3.2.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HPLC/RP) acoplada à espectrometria de massa (“electrospray ionization mass spectrometry” – ESI/MS).....	30
3.2.2 Características físico-químicas.....	32

3.2.2.1 Cor.....	32
3.2.2.2 Turbidez.....	33
3.2.2.3 Distribuição de tamanho e potencial zeta.....	33
3.2.2.4 Hidratação micelar.....	34
3.2.2.5 Percentual de sedimentação das caseínas.....	34
3.2.3 Estabilidade térmica.....	34
Resultados e Discussão.....	34
4.1 Defosforilação por via enzimática.....	34
4.1.1 Caseinato de sódio e caseinato de cálcio.....	34
4.1.1.1 pH.....	34
4.1.1.2 Concentração de Fósforo.....	35
4.1.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HLPC/RP) acoplada à espectrometria de massa (ESI/MS).....	37
4.1.1.4 Turbidez.....	39
4.1.2 Leite esterilizado (UHT) desnatado.....	40
4.1.2.1 pH.....	40
4.1.2.2 Concentração de Fósforo.....	41
4.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HLPC/RP) acoplada à espectrometria de massa (ESI/MS).....	43
4.1.3 Conclusão parcial – defosforilação por via enzimática.....	47
4.2 Defosforilação por acidificação.....	47
4.2.1 Caracterização físico-química do leite e partição de minerais entre as fases solúvel e coloidal durante a acidificação.....	48
4.2.2 Características físico-químicas gerais das amostras após diálise, liofilização e ressuspensão a 10 % (m/m).....	49
4.2.3 Características físico-químicas das amostras após diálise, liofilização e ressuspensão a 10 % (m/m).....	51
4.2.3.1 Cor.....	51
4.2.3.2 Distribuição de tamanho.....	52
4.2.3.3 Potencial zeta.....	53
4.2.3.4 Hidratação micelar.....	54
4.2.3.5 Percentual de sedimentação de caseínas.....	55
4.2.4 Estabilidade térmica.....	55
Conclusões e perspectivas.....	56

Referências Bibliográficas.....	57
--	-----------

Lista de figuras

Figura 1 - Modelo de micelas de caseína formadas por sub-micelas (Walstra, 1999).....	14
Figura 2 – Modelo de micela de caseína em estrutura aberta (Holt, 2003).....	16
Figura 3 – Modificações das micelas de caseína submetidas a diferentes condições físico-químicas (Gaucheron, 2005).....	19
Figura 4 – Equilíbrio de minerais entre as fases solúvel e coloidal/micelar (Gaucheron, 2004).....	20
Figura 5 - Esquema geral do experimento de defosforilação utilizando fosfatase alcalina de bezerro em suspensões de caseinato de sódio e de cálcio.....	24
Figura 6 – Esquema geral do experimento de defosforilação utilizando fosfatase alcalina de bezerro e fosfatase ácida de batata em leite esterilizado desnatado.....	26
Figura 7 – Esquema geral da defosforilação por via química em leite cru desnatado.....	28
Figura 8 – Comportamento do pH em função do tempo de incubação a 37° C das amostras de caseinato de sódio (CN-Na) (●) e caseinato de cálcio (CN-Ca) (■) tratadas fosfatase alcalina de bezerro, e CN-Na (controle) (▲).....	35
Figura 9 – Concentração de fósforo solúvel (Ps) (A) e fósforo orgânico (Po) (B) em função do tempo de incubação das amostras de caseinato de sódio (CN-Na) (●) e caseinato de cálcio (CN-Ca) (■) tratadas fosfatase alcalina de bezerro (■) e CN-Na (controle) (▲).....	37
Figura 10 – Perfil cromatográfico de suspensões de caseinato de sódio sem incubação (Fig. 10A), incubada durante 20 h na ausência de fosfatase alcalina de bezerro (Fig. 10B), e durante 20 h na presença de fosfatase alcalina de bezerro (Fig. 10C).....	38
Figure 11 – Log dos valores de turbidez determinados por densidade óptica a 600 nm em função do tempo de incubação das amostras de CN-Na (●) e CN-Ca (■) tratadas FAL, e CN-Na (controle) (▲).....	40
Figura 12 – Comportamento do pH em função do tempo de incubação a 37° C das amostras de leite esterilizado desnatado tratadas com fosfatase alcalina de bezerro (■), fosfatase ácida de batata (●) e controle (▲).....	40
Figura 13 - Concentração de fósforo inorgânico (Fig. 13A), fósforo solúvel (Fig. 13B) e fósforo orgânico (Fig. 13C) em função do tempo de incubação das	

amostras de leite esterilizado desnatado tratadas com fosfatase alcalina de bezerro (■), fosfatase ácida de batata (●) e controle (▲).....	42
Figura 14 - Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa acoplada à espectrometria de massa de leite esterilizado desnatado incubado durante 20 h a 37° C. Os picos cromatográficos (marcados de 1 a 6) foram detectados por corrente total de ionização (Fig. 14A) e por absorvância (Abs ou DO) no UV à 214 nm (Fig. 14B).....	44
Figura 15 – Perfil cromatográfico de leite esterilizado desnatado (Fig. 15A), leite esterilizado desnatado incubado durante 20 h a 37 °C na ausência de fosfatase (Fig. 15B) e durante 20 h na presença de fosfatase alcalina de bezerro (Fig. 15C) e fosfatase ácida de batata (Fig. 15D).....	45
Figura 16 – Distribuição de tamanho das micelas de caseína de acordo com a intensidade.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1 – Composição centesimal do leite de vaca (Walstra, 2006).....	3
Tabela 2 – Principais características das caseínas de origem bovina (Swaisgood, 2003; Farrel et al., 2004).....	6
Tabela 3 – Concentrações típicas dos principais íons encontrados no leite (Fox e McSweeney,1997).....	7
Tabela 4 – Distribuição aproximada de minerais entre as fases solúvel e coloidal (Lucey e Horne, 2009).....	8
Tabela 5 – Concentração (mM) de íons livres e em associação na fase solúvel do leite (Holt, Dalgleish e Jenness, 1981).....	9
Tabela 6 – Características gerais das micelas de caseína (Fox, 2008).....	11
Tabela 7 – Características físico-químicas gerais do leite utilizado na defosforilação por via química.....	48
Tabela 8 - Concentração de P e Ca solúvel de acordo com pH do leite. Os respectivos percentuais de solubilização de P e Ca também são apresentados.....	49
Tabela 9 – Valores de pH e matéria nitrogenada (total, NCN e NPN) das amostras após a desmineralização.....	50
Tabela 10 – Concentrações total e solúvel de P e Ca do leite após defosforilação.....	50
Tabela 11 – Valores de L* das amostras de leite após a desmineralização.....	52
Tabela 12 – Potencial Zeta das micelas de caseína após a defosforilação.....	54
Tabela 13 – Hidratação micelar das amostras após defosforilação.....	54
Tabela 14 - Percentual de caseínas sedimentáveis das amostras defosforiladas.....	55

Resumo

SILVA, Naaman F. Nogueira, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2010. **Defosforilação de caseínas por via enzimática e química**. Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Coorientadores: Jane Sélia dos Reis Coimbra, Frédéric Gaucheron, Luis Henrique Mendes da Silva.

No leite, as micelas de caseína encontram-se sob a forma de uma associação de moléculas altamente hidratadas, que são acessíveis às moléculas do solvente. Essa característica permite que as micelas de caseínas sejam passíveis de modificações quando as condições físico-químicas do meio são alteradas ou quando enzimas específicas são adicionadas ao leite. Nesse contexto, o objetivo geral do trabalho foi modificar a estrutura micelar das caseínas por meio da defosforilação por via enzimática (por fosfatases) e química (por acidificação). Inicialmente, foi realizada a defosforilação em suspensões de caseinato de sódio e de cálcio utilizando fosfatase alcalina de bezerro (FAL) (EC 3.1.3.2, Sigma, Saint Louis, USA). Observou-se que ambas as suspensões de caseinato foram defosforiladas por FAL e que a presença de cálcio influenciou negativamente a defosforilação. Após analisar a defosforilação em substratos mais simples, o foco do trabalho passou a ser a modificação das micelas de caseína em leite esterilizado (UHT) desnatado, utilizando FAL e fosfatase ácida de batata (FAC) (EC 3.1.3.1, Sigma, Saint Louis, USA). Entretanto, os perfis cromatográficos (HPLC/PR) e os espectros de massa (ESI/MS) das amostras de caseinato e leite demonstraram que as enzimas FAL e FAC estavam contaminadas por enzimas proteolíticas. Logo, a defosforilação observada em leite UHT desnatado ocorreu devido a duas possibilidades. Uma dessas possibilidades é que as Massas Molares das enzimas FAL e FAC não inviabilizaram seu acesso ao interior das micelas, e o envolvimento dos resíduos de fosfoserina na formação de fosfato de cálcio coloidal não impediu a defosforilação. Contudo, após verificar proteólise em ambas as amostras adicionadas de FAL e FAC, a defosforilação pode também ter ocorrido nos peptídeos fosforilados liberados para fase contínua do leite. Uma vez que tal contaminação inviabilizaria o conhecimento preciso da perda de grupos fosfato nas características das micelas de caseína, modificou-se a forma de defosforilação, que passou a ser de origem química, por acidificação.

Para isso, leite cru desnatado foi acidificado a pH 5,5, 6,1 e 6,7 (controle sem acidificação) a fim de solubilizar o fosfato de cálcio coloidal presente no interior das micelas de caseína. Após a acidificação as amostras foram dialisadas contra ultrafiltrado de leite, liofilizadas e ressuspendidas a 10 % (m/m). Como a etapa de acidificação leva à solubilização de outros minerais além do fósforo (Ca, Mg e citrato), a defosforilação por via química pode ser mais precisamente denominada de desmineralização. Os resultados indicam que a desmineralização das micelas de caseína em leite cru desnatado não influenciou características como potencial zeta, tamanho médio, distribuição de tamanho e hidratação micelar. Por outro lado a cor e o percentual de caseínas sedimentáveis diminuíram com o avanço da desmineralização. Esses resultados sugerem que as amostras desmineralizadas apresentavam caseínas como uma mistura de caseinato e micelas de caseína. À medida que a desmineralização foi mais intensa, a proporção de micelas de caseína diminuiu.

Abstract

SILVA, Naaman F. Nogueira, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, november of 2010. **Casein dephosphorylation by enzymatic and chemical way**. Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-Adivers: Jane Sélia dos Reis Coimbra, Frédéric Gaucheron, Luis Henrique Mendes da Silva.

In the milk, casein micelles are found in the shape of an association of highly hydrated molecules, which are accessible to the solvent molecules. This characteristic allow the casein micelles to be able to be modified when the physical-chemical conditions in the medium are changed or when the specific enzymes are added to the milk. In this context, the general objective of the study was to modify the casein micelle structure through the dephosphorylation by the enzymatic (with phosphatase) and chemical way (with acidification). At the beginning, the dephosphorylation was made in suspension of sodium and calcium caseinate using calf alkaline phosphatase (FAL) (Sigma 3.1.3.2, Saint Louis, USA). It was noticed that both of the suspension of caseinate was dephosphorilated by FAL and the presence of calcium affected negatively the dephosphorilation. After analyzing the dephosphorylation in more simple substrate, the focus of study start to be the modification of casein micelles in the UHT defatted milk, using the FAL and the potato acid phosphatase (FAC) (Sigma 3.1.3.1, Saint Louis, USA). The chromatographic profiles (HPLC/RP) and spectrum of mass (ESI/MS) of milk and caseinate samples showed that the FAL and FAC were contaminated by proteolytic enzymes. So, the the dephosphorylation observed in UHT defatted milk occurred due two possibilities. One possibility is the casein micelles structure and the involvement of phosphoseryn residues in the bridges of colloidal calcium phosphate didn't prevent the dephosphorylation. However, after to verify proteolysis in both samples with FAL and FAC, the dephosphorylation can be occurred in the peptides relesead in the continuous phase. Such contamination would make hard the knowledge of the phosphate groups lost in the characteristics of casein micelles. As a result the way of dephosphorylation was modified, so it became as a chemical origin, by acidification. For that, raw defatted milk was acidified to pH 5.5, 6.1and 6.7 (control without acidification) to soluble the colloidal calcium

phosphate present inside of casein micelles. After the acidification, the samples were dialyzed against the ultrafiltrated of milk, lyophilized and resuspended at 10% (m/m). As the step of acidification takes to solubilization of others minerals beside the phosphorus (Ca, Mg and citrate), the dephosphorylation by the chemical way can be more precisely called of demineralization. The results indicate that the demineralization of casein micelles in raw defatted milk didn't influence the characteristics as zeta potential, medium size, size distribution and micelar hydration. Nevertheless the values of whiteness and the percent of sedimentable caseins decreased with the advance of the demineralization. Those results suggest that the demineralized samples shown caseins as a mix of caseinate and casein micelles. As the demineralization was more intense, the proportion of the casein micelles reduced.

1. Introdução

A matéria nitrogenada do leite representa aproximadamente 3,4 % de sua massa. Ela pode ser dividida fundamentalmente em três grupos: caseínas, proteínas do soro e nitrogênio não protéico. As caseínas, grupo de fosfoproteínas específicas do leite, representam 80 % em média dessa fração. As principais caseínas do leite bovino são α_{s1} , α_{s2} , β e κ e correspondem, respectivamente, a 37, 10, 35 e 15 % do total de caseínas. Durante a síntese do leite na glândula mamária, essas proteínas passam por modificações que alteram profundamente suas características, destacando-se a glicosilação da κ -caseína e a fosforilação das α_{s1} , α_{s2} e β -caseínas.

As caseínas estão presentes no leite na forma de uma associação de moléculas altamente hidratadas, denominadas micelas de caseína. As micelas de caseína são geralmente esféricas com diâmetro variando de 50 a 500 nm, média de 150 nm, e massa variando de 10^6 a 3×10^9 Da, média de 10^8 Da. Em relação ao peso seco as micelas de caseína são compostas de 94 % de proteínas e 6 % de constituintes de baixo peso molar. Esses últimos são normalmente referidos como fosfato de cálcio coloidal e consistem principalmente de cálcio, fosfato, pequena quantidade de magnésio e citrato, além de traços de outras espécies.

O conhecimento sobre a estrutura das micelas de caseína é importante em função do papel ocupado por elas no processamento da indústria de laticínios. Processos como produção de leite UHT, leite condensado e leites reconstituídos são altamente dependentes da estabilidade micelar. Por outro lado, sua desestabilização controlada tem impacto significativo na funcionalidade de produtos como queijos, iogurtes, produtos congelados e caseinatos. Na ausência de conhecimento sobre a estrutura e propriedades das micelas de caseína, as tentativas de resolução de problemas da indústria passam a ser empíricas e com aplicabilidade restrita.

As associações intramicelares, caseína-caseína e caseína-minerais, são regidas pelas condições físico-químicas do meio. Logo, a alteração de fatores como pH, temperatura e força iônica modificam a estrutura e as propriedades das micelas. Além das mudanças causadas por alterações físico-químicas, as micelas de caseína estão sujeitas também a modificações de origem enzimática. Nesse contexto, o objetivo geral do trabalho foi modificar a

estrutura micelar das caseínas por meio da defosforilação por via enzimática e química. Os objetivos específicos da defosforilação por via enzimática foram:

I. Pesquisar o efeito do cálcio sobre a defosforilação por fosfatase alcalina de bezerro em suspensões de caseinato;

II. Verificar a acessibilidade da fosfatase alcalina de bezerro e da fosfatase ácida de batata aos resíduos fosfosserínicos no interior da estrutura micelar;

III. Modificar a estrutura das micelas de caseína utilizando fosfatase alcalina de bezerro e fosfatase ácida de batata em leite esterilizado (UHT) desnatado.

IV. Elucidar o efeito da defosforilação em leite UHT desnatado sobre a estrutura e propriedades físico-químicas das micelas de caseína.

Os objetivos específicos da defosforilação por via química foram:

V. Modificar a estrutura das micelas de caseína submetendo leite cru desnatado a uma acidificação controlada;

VI. Elucidar o efeito da defosforilação por via química sobre a estrutura e propriedades físico-químicas das micelas de caseína.

1. Revisão de Literatura

2.1 Leite

O leite pode ser entendido como um fluido secretado pelas fêmeas de mamíferos com o propósito de satisfazer os requerimentos nutricionais dos recém nascidos. Como tal, constitui-se na única fonte de energia, provida por lipídeos e lactose, aminoácidos, ácidos graxos essenciais, vitaminas, elementos inorgânicos e água para os neonatos. Apresenta ainda um importante papel fisiológico representado principalmente por fatores de crescimento, enzimas, hormônios, compostos antibacterianos, proteínas e peptídeos, incluindo imunoglobulinas (Fox, 2003).

A fim de caracterizar adequadamente o leite de vaca torna-se importante descrever algumas de suas propriedades. O valor médio de pH situa-se em 6,7 sob temperatura ambiente. Apresenta uma constante dielétrica média de 80, à temperatura 20° C, a qual é aproximadamente a mesma da água pura. Embora a viscosidade seja duas vezes maior que a da água, comporta-se como fluido newtoniano. As substâncias dissolvidas conferem pressão osmótica média de

700 kPa (7 bar) e atividade de água de 0,995. Possui densidade média de 1029 kg/m³, a qual varia principalmente em função do teor de gordura (Walstra, 2006).

Sob uma perspectiva físico-química, o leite é considerado como uma dispersão coloidal contendo glóbulos de gordura, micelas de caseína e proteínas do soro e também como uma solução aquosa de sais, lactose e outros compostos minoritários (Fox, 1998). A composição do leite é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal do leite de vaca (Walstra, 2006).

Constituinte	Conteúdo médio no leite (% m/m)	Varição (% m/m)
Água	87,1	83,5 – 88,7
Sólidos não-gordurosos	8,9	7,9 – 10
Gordura no extrato seco	31	22 – 38
Lactose	4,6	3,8 – 5,3
Gordura	3,6	2,5 – 5,5
Proteínas	3,4	2,3 – 4,4
Caseínas	2,6	1,7 – 3,5
Minerais	0,7	0,57 – 0,83
Ácidos orgânicos	0,17	0,12 – 0,21
Diversos	0,15	-

A matéria nitrogenada do leite representa aproximadamente 3,4 % de sua massa. Ela pode ser dividida fundamentalmente em três grupos: caseínas, proteínas do soro e nitrogênio não protéico. As caseínas, grupo de fosfoproteínas específicas do leite, representam 80 % (m/m) em média dessa fração e são, possivelmente, o sistema protéico alimentar melhor caracterizado (Swaisgood, 2003).

2.2 Caseínas

Até início do século XX acreditava-se que a caseína era uma proteína homogênea, constituída de apenas uma espécie molecular obtida por coagulação ácida do leite a pH 4,6 (caseína isoeletrica). Entretanto

Linderstrom-Lang (1929) tratou caseína isoelétrica com misturas de etanol e HCl, conseguindo isolar três frações que diferiam-se quanto ao conteúdo de fósforo. Deste modo, foi o primeiro autor a demonstrar a heterogeneidade entre essas proteínas. Porém, somente com o trabalho de Mellander (1939) que essa heterogeneidade foi cientificamente aceita. Este autor, partindo de caseína isoelétrica e utilizando ultracentrifugação analítica e eletroforese de fronteira livre, obteve três diferentes frações, sendo o primeiro a empregar os termos α , β , e γ , em ordem decrescente de mobilidade eletroforética. Em 1956, Waugh e Von Hippel exploraram a susceptibilidade das caseínas à precipitação em presença de diferentes concentrações de cálcio e descobriram que a fração α -caseína era uma mistura de α e κ -caseína.

Annan e Manson (1969) estudaram a heterogeneidade da fração α -caseína. Estes autores produziram caseína isoelétrica e purificaram o complexo de α -caseína por meio de cromatografia de troca iônica, utilizando coluna de sulfoetil Sephadex C-50. Eles isolaram seis diferentes moléculas de α -caseína (α_{s0} a α_{s6}) utilizando eletroforese em gel de amido. Essas moléculas foram reagrupadas em função do número de grupos fosfato e são descritas por Fox (2003) como α_{s1} , contendo 8 e ocasionalmente 9 fosfatos por molécula e α_{s2} , contendo 10 a 13 fosfatos por molécula.

Não obstante, a introdução de outras técnicas eletroforéticas como a análise eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE) (Peterson, 1963; Van Hekken e Thompson, 1992) permitiu identificar elevada heterogeneidade entre as caseínas, as quais foram atribuídas a pequenas variações na constituição entre as principais caseínas. Essas variações são referidas como microheterogeneidade e de acordo com Fox (2003), os principais fatores são o polimorfismo genético, a variação no grau de fosforilação, a glicosilação e a presença de cisteína em α_{s2} e κ -caseínas.

Segundo Holland (2009), parte da microheterogeneidade das caseínas é devida a processos chamados de “modificações pós-tradução” que ocorrem no retículo endoplasmático e/ou no complexo de Golgi das células do tecido mamário. Entre os vários fatores que controlam os processos de modificação, destacam-se: a expressão de enzimas necessárias à modificação, a disponibilidade de seus substratos e a acessibilidade das enzimas aos sítios de atuação, principalmente após envelhecimento. Essas modificações podem ser

divididas em dois tipos principais, a glicosilação da fração κ -caseína e a fosforilação das frações α_s e β -caseínas.

A fração κ -caseína passa por processo chamado de O-glicosilação, no qual os resíduos de treonina localizados na parte C-terminal sofrem adição de moléculas de galactose, N-acetilgalactosamina e ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) na forma de tri ou tetra-sacarídeos. Como resultado, aproximadamente 40 % das cadeias de κ -caseína permanece não-glicosiladas, enquanto que os 60 % restantes estão ligadas à pelo menos de seis moléculas de açúcar (Vreeman et al., 1986). Mollé e Leonil, 1995 identificaram uma distribuição de 14 formas glicosiladas diferentemente na parte C-terminal da cadeia.

As frações α_s e β -caseínas possuem o aminoácido serina distribuído ao longo de suas cadeias em seqüências de dois, três ou quatro resíduos. Porém, o processo de fosforilação necessita de um reconhecimento enzimático da seqüência consenso Ser/Thr-X-A, sendo X um resíduo qualquer e A um resíduo glutamyl, aspartil ou seril (Mercier, 1981). Estas seqüências de fosforilação formam regiões aniônicas que provocam queda no perfil de hidrofobicidade das caseínas.

Excetuando-se as regiões que contêm os sítios de fosforilação, as caseínas são distintamente hidrofóbicas. A segregação de regiões/seqüências hidrofílicas e hidrofóbicas confere uma definida natureza anfipática às caseínas, a qual é primordial a capacidade de funcionar como bons agentes emulsificantes (Horne, 2009).

O leite contém naturalmente enzimas originárias do sangue, dentre elas destaca-se a plasmina. Essa enzima apresenta especificidade às ligações com o aminoácido lisina e hidrolisa principalmente a β -caseína em diferentes posições ao longo da cadeia. Como resultado há liberação da parte C-terminal, que é denominada de γ -caseína. A fração γ -caseína pode representar até 3 % do total das caseínas (Fox, 2003).

Segundo Fox (2003) as quatro principais caseínas do leite bovino são α_{s1} , α_{s2} , β e κ e representam respectivamente 37, 10, 35 e 15 % do total de caseínas. Entre suas principais características (Tabela 2), duas apresentam papel fundamental para a estrutura. A primeira diz respeito à importante presença de resíduos de prolina, principalmente na β -caseína, na qual

representa 17 % do total dos aminoácidos. A presença de múltiplos resíduos de prolina afeta a organização espacial das proteínas, interrompendo estruturas secundárias do tipo α -hélice e folha β . A segunda refere-se à presença de dois resíduos de cisteína nas frações α_{s2} e κ -caseína, que permitem a formação de pontes dissulfeto intra ou intermoleculares. Além desses fatores, as caseínas são ricas em resíduos de glutamina e asparagina que estão sob forma ionizada ($pK = 4,5 - 4,7$) no pH do leite, e contribuem significativamente para a formação de cargas negativas.

Tabela 2 – Principais características das caseínas de origem bovina (Swaisgood, 2003; Farrel et al., 2004).

	α -s1 caseína (Variante B 8P)	α -s2 caseína (Variante A 11P)	β -caseína (Variante A ² 5P)	κ -caseína (Variante B 1P)
Nº de variantes genéticas	5	4	7	2
Massa Molar (Da)	23614	25230	23983	19023
Concentração (g/L)	10	2,6	9,3	3,3
Amino-ácidos	199	207	209	169
Prolina	17	10	35	20
Cisteína	0	2	0	2
Ácido glutâmico	24	25	18	13
Ácido aspártico	7	4	4	4
Fosfoserina	8	11	5	1
Glicosilação	0	0	0	0 – 5
Carga pH 6,6 (mV)	-21	-15	-12	-3
pI	4,94	5,37	5,14	5,90
Precipitação (CaCl ₂ / pH 7)	+	+	+	-

As quatro principais caseínas podem ser divididas essencialmente em dois grupos: um grupo precipitável e outro não precipitável na concentração de íons cálcio encontrada no leite. As frações α_{s1} , α_{s2} e β -caseína compõem o grupo de caseínas precipitáveis, fato que está relacionado aos elevados índices de fosforilação (Swaisgood, 2003). Inversamente, o grupo representado pela fração κ -caseína é não é precipitável em baixas concentrações de cálcio

devido ao reduzido grau de fosforilação. Como todas estão presentes na micela de caseína, a fração κ -caseína inibe a precipitação das α_{s1} , α_{s2} e β -caseínas numa proporção dez vezes maior que a sua própria massa (Fox, 2008).

2.3 Minerais

As propriedades das caseína estão relacionadas às suas interações com os minerais presentes no leite, principalmente cálcio e fósforo. Uma vez que o leite contém vasta gama de espécies iônicas, é importante que se faça uma distinção entre os macro-elementos (Tabela 3) e elementos “traço”. Nessa revisão, a palavra minerais será aplicada apenas às espécies iônicas de baixa massa molar que estão presentes em concentrações relevantes, incluindo os minerais orgânicos, por exemplo o citrato, que participam do equilíbrio de minerais do leite.

Tabela 3 – Concentrações típicas dos principais íons encontrados no leite (Fox e McSweeney, 1997).

Íons	Concentração média (mM)	Variação
Sódio	22	15 – 26
Potássio	37	34,5 – 40
Cálcio	30	25 – 35
Magnésio	5	4 – 6,5
Fósforo (total)	30	24 – 35
Fósforo (inorgânico)	23	
Cloreto	28	22,5 – 39,5
Sulfato	1	
Carbonato (CO ₂)	4,5	
Citrato (ácido cítrico)	9	

Os minerais determinam várias propriedades do leite, incluindo a formação e estabilidade das micelas de caseína e propriedades coligativas como ponto de congelamento, ponto de ebulição, pressão osmótica e pressão de vapor. Sob o ponto de vista tecnológico, os minerais impactam a estabilidade protéica durante o processamento (coagulação enzimática e

térmica, estabilidade ao etanol), a textura de vários tipos de géis e queijos e a estabilidade de espumas (Lucey e Horne, 2009).

No leite, os macro-elementos estão distribuídos entre a fase contínua e a fase dispersa (coloidal ou micelar) de acordo com a Tabela 4. A determinação da presença entre essas fases é dependente de condições ambientais como temperatura, pH, força iônica, etc. Potássio, sódio e cloreto são essencialmente solúveis ao passo que cálcio, magnésio, fósforo e citrato estão parcialmente associados às micelas de caseína (Gaucheron, 2005). Cálcio e magnésio apresentam-se em baixas concentrações como íons livres em função de estarem associados em grande parte ao citrato e fosfato (Tabela 5). A ligação entre cátions e ânions é dependente da solubilidade dos íons, assim como da constante de interação entre os eles (Gaucheron, 2004; Walstra, 2006).

A distribuição dos sais entre fase dispersa e contínua pode ser determinada por diálise, ultrafiltração, ultracentrifugação e obtenção de soro por coagulação enzimática (Davies e White, 1960; de la Fuente et al., 1996, Walstra, 2006). Todavia, é necessário utilizar um fator de correção de 0,96 devido ao efeito do volume de exclusão. Os minerais que estão sob forma solúvel conferem força iônica ao leite de 0,073 M, a qual varia normalmente entre 0,067 e 0,080 M.

O fósforo presente no leite é particularmente encontrado sob três formas. O fósforo orgânico (Po) diz respeito aos grupos fosfatos que estão esterificados principalmente aos resíduos de serina e em menor extensão treonina. O fósforo inorgânico (Pi) engloba o fósforo presente sob forma coloidal (que é completamente solubilizado a pH 4,6) e o fósforo sob a forma solúvel (Ps). Logo, a concentração de fósforo orgânico no leite pode ser expressa como a diferença entre a concentração de fósforo total subtraída da concentração de fósforo inorgânico.

Tabela 4 – Distribuição aproximada de minerais entre as fases solúvel e coloidal (Lucey e Horne, 2009).

	Coloidal (micelar) (%)	Solúvel (difusível) (%)
Cálcio	69	31
Magnésio	47	53

Potássio	6	94
Sódio	5	95
Fósforo inorgânico	53	47
Citrato	14	86
Cloreto	5	95

Tabela 5 – Concentração (mM) de íons livres e em associação na fase solúvel do leite (Holt, Dalgleish e Jenness, 1981).

Ânion	Íon livre	Íon complexado			
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
H ₂ Cit ⁻	+	+	+	+	+
Hcit ²⁻	0,04	0,01	+	+	+
Cit ³⁻	0,26	6,96	2,02	0,03	0,04
H ₂ PO ₄ ⁻	7,50	0,07	0,04	0,10	0,18
HPO ₄ ²⁻	2,65	0,59	0,34	0,39	0,52
PO ₄ ³⁻	+	0,01	+	+	+
Glc 1-PH ⁻	0,50	+	+	0,01	0,01
Glc 1-P ²⁻	1,59	0,17	0,07	0,10	0,14
H ₂ CO ₃	0,11	-	-	-	-
HCO ₃ ⁻	0,32	0,01	+	+	+
CO ₃ ²⁻	+	+	+	+	+
Cl ⁻	30,9	0,26	0,07	0,39	0,68
HSO ₄ ⁻	+	+	+	+	+
SO ₄ ²⁻	0,96	0,07	0,03	0,04	0,10
RCOOH	0,02	-	-	-	-
RCOO ⁻	2,98	0,03	0,02	0,02	0,04
Íon livre		2,00	0,81	20,92	36,29

2.3.1 Fosfato de Cálcio

A fase contínua do leite consiste em uma solução supersaturada de cálcio e fósforo. Esse fato conduz à procura de um estado termodinamicamente mais favorável, o qual se traduz pelo fenômeno da nucleação (Walstra, 2006). Holt (2003) acredita que é muito provável que o fenômeno da nucleação dos sais de fosfato de cálcio ocorra nos centros de fosfatos das caseínas. Segundo

esse autor, a razão para isso é que embora a fase contínua do leite esteja supersaturada em relação aos sais de fosfato e cálcio, a taxa de nucleação (homogênea) é muito baixa. Contudo, a concentração de caseínas é muito alta em relação à concentração de núcleos estáveis de fosfato de cálcio. Logo, devido à interação química dos centros fosfosserínicos pelo fosfato de cálcio, há redução da área superficial (com excesso de energia livre) dos núcleos de fosfato de cálcio recém formados. Consequentemente, a probabilidade da nucleação ocorrer em outro ponto é pequena.

De acordo com Holt (2003), o crescimento dos núcleos de fosfato de cálcio é cessado quando outros centros fosfosserínicos interagem com sua superfície e a dessolvatação dos íons cálcio passa a ser termodinamicamente desfavorável. Na medida em que a supersaturação decai, o crescimento dos núcleos de fosfato de cálcio (conhecidos como fosfato de cálcio micelar, fosfato de cálcio coloidal ou nanoclusters de fosfato de cálcio) mais estáveis predomina.

2.4 Micelas de caseína

2.4.1 Características gerais

Inicialmente, é importante ressaltar que o termo micelas de caseína foi utilizado antes de um conhecimento aprofundado dessas estruturas, portanto elas não demonstram uma estrutura micelar clássica. Dickinson (1992) argumenta que as partículas de caseínas não são micelas verdadeiras e recomenda que o termo “micelas de caseína” não seja abreviado somente para micelas. Este autor assume as micelas de sabão como modelo padrão. O termo micelas de caseínas foi utilizado inicialmente no trabalho de Beau (1921). Todavia somente a partir dos trabalhos de Waugh e colaboradores (1956, 1965, 1971) que começou ser amplamente difundido nas publicações científicas sobre leite e derivados lácteos.

As caseínas estão presentes no leite como uma associação de moléculas altamente hidratadas, denominadas micelas de caseína, que consistem de 94 % de caseínas e 6 % de constituintes de baixo peso molar. Esses últimos são normalmente referidos como fosfato de cálcio coloidal. Todavia consistem principalmente de cálcio, fosfato, pequena quantidade de magnésio e citrato, além de traços de outras espécies (de Kruif e Holt, 2003).

No Compêndio de Terminologia Química publicado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1997), as micelas de caseína podem ser descritas como partículas de tamanho coloidal, denominadas como supramoléculas, ou ainda como entidades moleculares organizadas e mantidas em conjunto por meio de interações intermoleculares não covalentes.

Por meio de microscopia eletrônica constata-se que as micelas de caseína são geralmente esféricas com diâmetro variando de 50 a 500 nm, média de 150 nm, e massa variando de 10^6 a 3×10^9 Da, média de 10^8 Da. São encontradas em uma proporção de 10^{14} a 10^{16} micelas/mL de leite. Pequenas micelas também estão presentes em grande quantidade, porém representam ínfima proporção da massa (FOX, 2003). Suas propriedades são descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características gerais das micelas de caseína (Fox, 2008).

Características	Valor
Diâmetro	150 nm (variando de 50-500 nm)
Área superficial	$8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$
Volume	$2,1 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
Densidade (hidratada)	$1,0632 \text{ g.cm}^3$
Massa	$2,2 \times 10^{-15} \text{ g}$
Conteúdo de água	63 %
Hidratação	$3,7 \text{ g H}_2\text{O.g}^{-1}$
Massa Molar (hidratada)	$1,3 \times 10^9 \text{ Da}$
Massa Molar (desidratada)	$5 \times 10^8 \text{ Da}$
Nº cadeias polipeptídicas	5×10^3
Nº partículas por mL de leite	$10^{14} - 10^{16}$
Superfície micelar por mL de leite	$5 \times 10^4 \text{ cm}^2$
Distância livre média	240 nm

As caseínas não apresentam conformação terciária (tridimensional) rígida e possuem a capacidade de reagir rapidamente às mudanças ambientais. Conseqüentemente, após sua síntese, atuam como pontos de nucleação para a formação do fosfato de cálcio coloidal, prevenindo a precipitação e calcificação dos sistemas de síntese e transporte do leite na

glândula mamária (Horne, 2002; de Kruif e Holt, 2003;). Horne (2002) propõe que as micelas de caseína e seus respectivos monômeros diferem em um aspecto crucial, as micelas contêm fosfato de cálcio coloidal presente como pequenas inclusões microcristalinas.

2.4.2 κ -caseína e seu papel estabilizador da micela

Além da inequívoca importância para a provisão de aminoácidos, cálcio e fósforo à nutrição infantil (McMahon e Oommen 2007), a organização estrutural das micelas de caseína é crítica para a determinação das propriedades físicas do leite. Conseqüentemente, a estabilidade da micela de caseína ou sua desestabilização controlada, como no caso de queijos e leites fermentados, é uma questão crucial para a indústria de laticínios.

A estabilidade das micelas de caseína é fortemente dependente do ambiente iônico. Micelas não são formadas na ausência de cálcio, porém altas concentrações causam precipitação (WAUGH, 1965). Esse mesmo fenômeno pode ser observado em altas concentrações de cloreto de sódio (Zittle e Jasewicz, 1962). Todavia, enquanto a maior parte das caseínas é susceptível à precipitação sob influência do ambiente iônico, principalmente em relação à concentração dos íons cálcio, a κ -caseína normalmente não é precipitável (Waugh, 1965 e 1971). Tendo em vista a concentração de cálcio do leite, esse comportamento sugere um papel estabilizador da micela pela κ -caseína.

O fracionamento das micelas de caseína de acordo com seu tamanho pode ser realizado submetendo-se o leite a sucessivas etapas de centrifugação. A proporção de α_{s1} e α_{s2} -caseína nas micelas permanece constante independentemente de seu tamanho. Porém o conteúdo de κ -caseína apresenta uma relação inversa com o tamanho da micela de caseína (Donnelly et al., 1984; Dalgleish et al., 1989b). Considerando que em uma esfera a razão superfície/volume é inversamente proporcional ao raio, esses resultados implicam uma localização superficial da κ -caseína.

A sequência completa da κ -caseína foi reportada pela primeira vez em 1973 (Mercier et al., 1973). Essa proteína consiste em uma cadeia simples com 169 amino-ácidos, com massa molar de 19023 Da e ponto isoelétrico 5,93. Ela contém dois resíduos de cisteína e um de fosfoserina, porém é pouco provável que esse resíduo de fosfoserina participe da formação de pontes de

fosfato de cálcio em função de sua localização na porção polar C-terminal da cadeia polipeptídica.

O processo de glicosilação que incide sobre a κ -caseína contribui para a ampliação do tamanho e hidrofília da porção C-terminal. Isto ocorre devido ao esqueleto estrutural dos resíduos de açúcares e de suas camadas de hidratação, juntamente com a carga residual negativa oriunda da ionização do ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) no pH do leite (Holland, 2009). Este mesmo autor sugere que quanto maior for grau de glicosilação da κ -caseína, maior será seu efeito estabilizador na micela. Dóí et al., 1979 observou que há uma correlação negativa entre o grau de glicosilação da κ -caseína e sua susceptibilidade à hidrólise pela quimosina e outras proteases.

2.4.3 Organização estrutural e modelos

O conhecimento sobre a estrutura das micelas de caseína é importante devido ao seu papel na indústria láctea, por exemplo, na fabricação de queijos, na estabilidade de leite UHT, leite condensado, leite reconstituídos e produtos congelados. Na ausência de conhecimento sobre a estrutura e propriedades das micelas de caseína, as tentativas de resolução de problemas da indústria de laticínios passam a ser empíricas e com aplicabilidade restrita. Por conseguinte, esse grupo particular de moléculas vem despertando a curiosidade de cientistas desde séculos passados, com primeiros estudos datando do início dos séculos XIX (Berzelius, 1814 e Braconnet, 1830) e XX (Beau and Bourgain, 1926; Beau, 1926, 1932a, 1932b, 1941).

Após a primeira metade do século XX, vários modelos estruturais foram propostos para as micelas de caseína e várias revisões foram publicadas (Schmidt, 1982; McMahon and Brown, 1984; Walstra, 1990 e 1999; Rollema 1992; de Kruif and Holt, 2003; Horne, 1998 e 2006, Farrel et al., 2006). Contudo, as micelas de caseína não apresentam um tamanho único e sua alta flexibilidade conformacional impossibilita o processo de cristalização. Consequentemente a visualização e a compreensão de sua estrutura são complexas (Smith e Campbel, 2007).

Uma análise preliminar da sequência de aminoácidos das caseínas sugere uma conformação extendida dessas proteínas em função da elevada frequência de prolina, acarretando consequentemente na redução de

conformações secundárias e terciárias. Entretanto, o estabelecimento de um modelo conformacional para as micelas de caseína ainda demanda estudos com elevado grau de sofisticação, incluindo ressonância magnética nuclear, modelagem molecular e microscopias eletrônicas. Segundo Horne (2009) para qualquer modelo de micela de caseína sugerido, faz-se necessário considerar a localização superficial da κ -caseína assim como seu papel estabilizador.

Em meio aos vários modelos propostos para a estrutura da micela de caseína, dois em particular parecem mais consistentes, o modelo de estrutura aberta (Holt, 1992; de Kruif e Holt, 2003; Dalgleish, 2004) e o modelo de sub-micelas (Schmidt, 1982; Walstra, 1999).

O modelo de sub-micelas (Figura 1) foi proposto a partir de estudos utilizando microscopia eletrônica, nos quais foram observadas estruturas com dimensões entre 5-25 nm, denominadas sub-micelas. Nesse modelo, a hipótese é de que as sub-micelas estão unidas por meio da ligação das caseínas com o fosfato de cálcio coloidal (Slatterly, 1973; Schmidt, 1982; Walstra, 1999. Contudo, Rollema (1992) propôs que além das ligações por fosfato de cálcio, há participação de interações hidrofóbicas na formação das micelas como um todo.

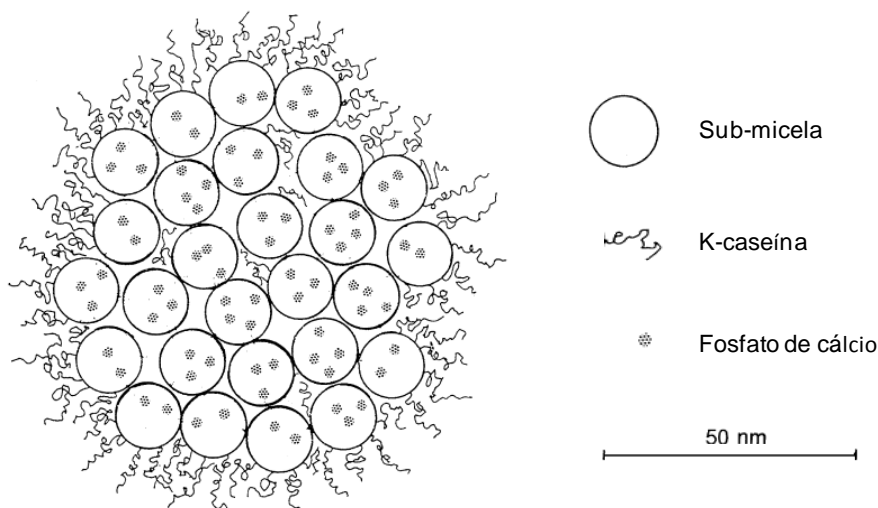


Figura 1 - Modelo de micelas de caseína formadas por sub-micelas (Walstra, 1999).

Apesar do modelo de sub-micelas ter sido alvo de numerosos estudos (Slatterly, 1973; Schmidt, 1982; Waltra, 1999), a preparação de amostras para

as técnicas de microscopia eletrônica produzem indesejáveis artefatos que podem ser erroneamente interpretados como sub-micelas. Observa-se, por exemplo, uma contração das partículas quando estas são submetidas aos procedimentos de fixação e desidratação utilizados em microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão (McMahon e McManus, 1998; Holt et al., 2003; Dalgleish et al., 2004).

Os modelos de estrutura aberta e de sub-micelas concordam em um aspecto; a elevada ocorrência da fração κ -caseína na superfície da micela e a falta desta molécula em seu interior. Em ambos os modelos, as moléculas de κ -caseína apresentam-se com a parte C-terminal proeminente, estendendo-se de 5-10 nm da superfície da micela, para formar uma camada denominada pilosa (hairy-layer). Essa camada confere estabilidade à micela devido ao seu baixo potencial zeta de - 20 mV, somado à estabilização espacial (de Kruif e Holt, 2003).

Horne (1998, 2006) descreve o papel das interações hidrofóbicas e iônicas na formação das micelas de caseína no modelo de estrutura aberta (Figura 2). Esse autor leva em consideração as estruturas individuais das caseínas e ressalta o importante papel da formação de “pontes” de fosfato de cálcio coloidal entre elas e não entre sub-micelas. De acordo com de Kruif e Holt (2003) cada “nanocluster” de fosfato de cálcio coloidal pode se ligar a cinco cadeias polipeptídicas e, considerando que as caseínas α_{s1} , α_{s2} e β apresentam duas ou mais sequências de resíduos fosfoserina, o fosfato de cálcio coloidal torna-se imprescindível à formação de uma estrutura micelar tridimensional.

Horne (2009) salienta que apesar das interações de origem hidrofóbicas serem relativamente fracas, elas estão presentes em elevado número nas micelas de caseína e contribuem para a sustentação do estrutura micelar. Haja vista a manutenção da dessa estrutura após a acidificação do leite, a qual resulta em dissolução do fosfato de cálcio coloidal (Marchin et al., 2007).

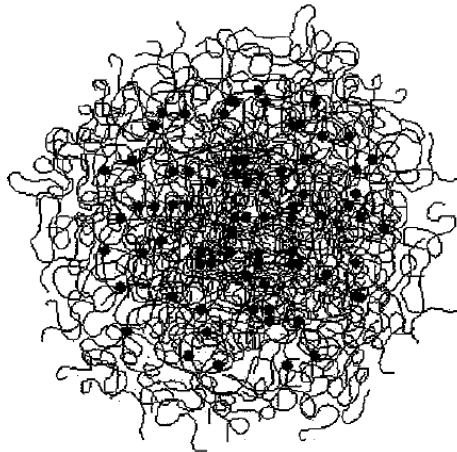


Figura 2 – Modelo de micela de caseína em estrutura aberta (Holt, 2003).

A importância de conhecer as características individuais das caseínas e a organização estrutural das micelas está ligada ao impacto que esses fatores apresentam sobre a funcionalidade.

A funcionalidade das proteínas alimentares é complexa e depende de numerosos fatores, como tipo de proteína, estrutura tridimensional, propriedades de superfície e ambiente físico-químico, como pH, temperatura, força iônica, natureza dos íons presentes/associados. Essa funcionalidade se manifesta sob diferentes formas como solubilidade, capacidade de formação de géis, viscosidade, estabilidade ao aquecimento, capacidade de formação e estabilidade de espumas e emulsões, etc (Walstra, 2006).

2.5 Modificações enzimáticas

Como as caseínas apresentam muitos grupos carregados e tendo em vista que as micelas são formadas por centenas ou milhares de monômeros, é conveniente considerar que as micelas de caseína apresentam estrutura relativamente porosa e acessível às moléculas do solvente. Esta consideração recebeu evidência experimental a partir do trabalho de Ribadeau-Dumas e Gamier (1970), que demonstraram que uma enzima, a Carboxipeptidase A, com massa molar de 40 kDa conseguia remover quantitativamente resíduos carboxílicos terminais das α , β , e κ -caseínas em micelas nativas.

Estas evidências culminaram em numerosos estudos sobre a modificação enzimática das micelas de caseína e de suas frações isoladamente. Nesses trabalhos observa-se a busca por melhor compreensão

da organização estrutural das micelas de caseína, além da procura pela otimização de suas características funcionais como: aptidão ao tratamento térmico, solubilidade, viscosidade, formação de espumas e emulsões (Van Hekken & Strange, 1993; Molina et al., 2005; Bonish et al., 2008; Huppertz e de Kruif, 2008; Miwa et al., 2010).

Van Hekken e Strange (1993 e 1994) avaliaram as modificações das propriedades funcionais de caseinato de sódio após defosforilação por fosfatase ácida de batata. Esses autores utilizaram dois níveis de defosforilação empregando diferentes concentrações da enzima, porém padronizaram o tempo e a temperatura, alcançando 40 % e 93 % de defosforilação. O perfil eletroforético em UREA-PAGE das amostras adicionadas de fosfatase mostrou bandas múltiplas e difusas, que os autores atribuíram a variados níveis de defosforilação. As amostras foram analisadas também quanto à solubilidade em valores de pH entre 3 e 8. Com o aumento do percentual de defosforilação observou-se maior solubilidade em pH ácido (próximo a 3). Segundo o autor, o ponto isoelétrico (PI) das caseínas defosforiladas aumentou com o percentual de defosforilação, logo essas moléculas apresentavam-se eletricamente mais carregadas em valores de pH ácidos (abaixo do PI), fato que permitiu maior solubilidade.

Molina et al. (2007) utilizaram fosfatase ácida de batata para pesquisar o efeito da defosforilação em caseinato de sódio e em padrões de α_{s1} , α_{s2} e β -caseína. O caseinato sofreu 71,6 % de defosforilação ao passo que as α e β -caseínas purificadas sofreram 89,2 % e 73,7 % respectivamente. A partir do uso da espectrometria de massa (electrospray ionization mass spectrometry) foi verificada a remoção de 1, 2, 4, 6, 7, ou 8 fosfatos em α_{s1} e α_{s2} -caseína e 1, 2, 3, 4, ou 5 fosfatos em β -caseína. A massa molar decresceu aproximadamente 80 Da após cada defosforilação.

Li-Chian e Nakai (1989) estudaram a digestibilidade de caseínas parcialmente defosforiladas baseando-se na susceptibilidade à hidrólise por pepsina e pancreatina a pH 4,0 e 2,0. Foram utilizadas fosfatase ácida de batata e fosfatase alcalina de bezerros para promover a defosforilação de caseinato de sódio, α_{s1} e β -caseína. Foi observado que a fosfatase alcalina é capaz de promover a defosforilação de caseínas, porém em níveis inferiores aos apresentados pela fosfatase ácida. O caseinato de sódio incubado com

fosfatase alcalina apresentou 10% de defosforilação, enquanto α_{s1} e β -caseína apresentaram 58 % e 52 % de defosforilação, respectivamente. Ao utilizar fosfatase ácida, os níveis de defosforilação atingiram 97 % para caseinato de sódio, 70 % para α_{s1} -caseína e 99 % para β -caseína. O perfil eletroforético (PAGE) das amostras defosforiladas mostraram múltiplas bandas. Os resultados indicaram maior susceptibilidade das amostras defosforiladas à hidrólise por pepsina e pancreatina.

A utilização de fosfatases com outras enzimas foi estudada por Hiller e Lorenzen (2009). Caseinato de sódio previamente incubado com fosfatase ácida de batata ou fosfatase alcalina de bezerro foi adicionado de transglutaminase, porém a defosforilação não foi quantificada. Algumas propriedades funcionais e a distribuição de massa molar foram pesquisadas posteriormente. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com adição de fosfatase e transglutaminase e o tratamento sem adição de enzimas com respeito à estabilidade térmica e tensão superficial. A viscosidade das suspensões tratadas com fosfatase e transglutaminase foi superior à da suspensão tratada somente com transglutaminase, porém todas foram inferiores à amostra sem adição de enzimas. Os tratamentos com ambas as fosfatases causaram aumento significativo na proporção de moléculas com massas molares inferiores à amostra controle. O autor argumenta que essa mudança pode ser devida à perda de grupos fosfatos e à proteólise secundária devido a enzimas contaminantes. Ratificando esses resultados, foi observado aumento do teor de nitrogênio solúvel de 270 e 155% para as amostras tratadas com fosfatase alcalina e fosfatase ácida, respectivamente.

2.6 Micela de caseína – uma estrutura dinâmica

A estrutura micelar dinâmica das caseínas permite que elas sejam passíveis de modificação quando as condições físico-químicas são alteradas, como temperatura, pressão, força iônica e pH. Tratamentos tecnológicos aplicados ao leite podem alterar consideravelmente o equilíbrio de minerais e a estabilidade das micelas de caseína. Uma representação dessas condições é mostrada na Figura 3.

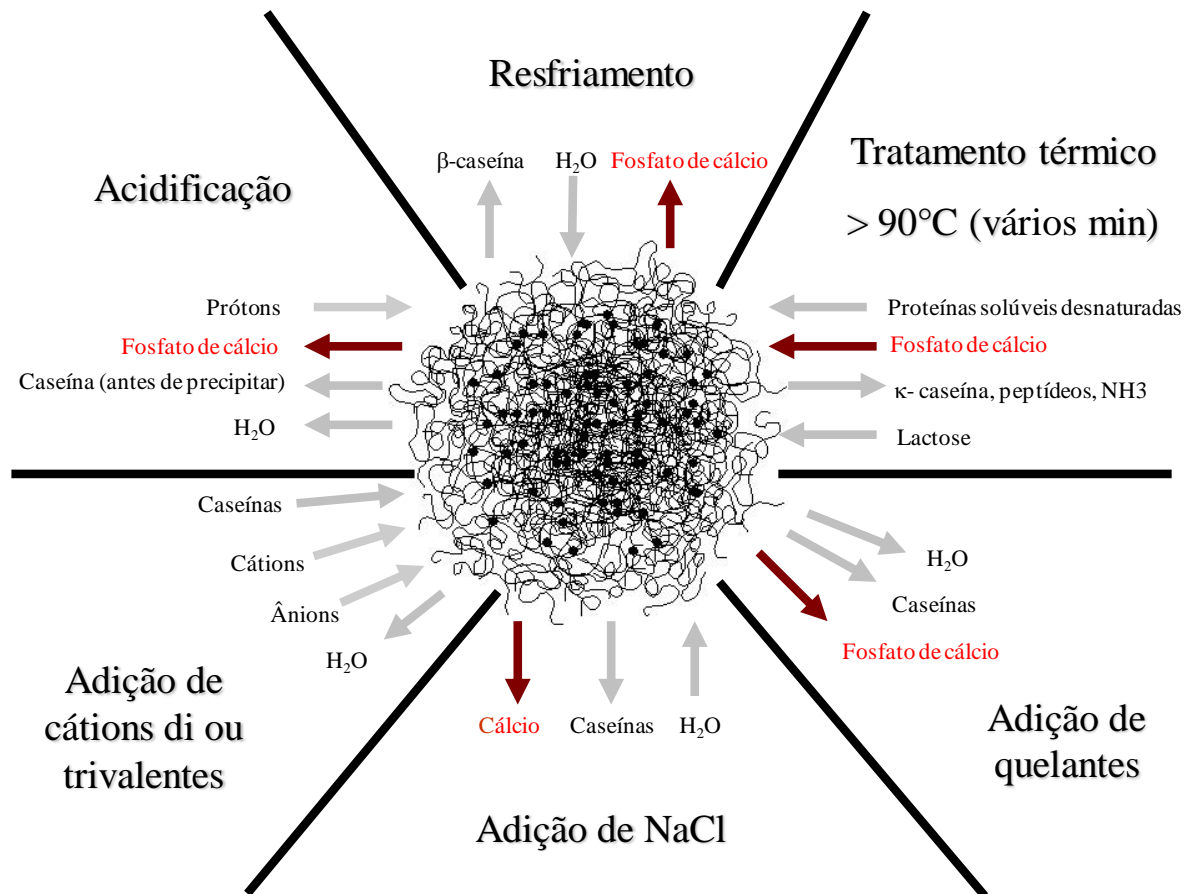


Figura 3 – Modificações das micelas de caseína submetidas a diferentes condições físico-químicas (Gaucheron, 2005).

A refrigeração do leite, por exemplo, provoca alterações na composição bioquímica e mineral das micelas de caseína. Em temperaturas inferiores a 10 °C observa-se significativa solubilização de β-caseína (Dalglish e Law, 1998). Segundo Martin et al., 2007 a solubilização de β-caseína não resulta em ruptura da estrutura interna das micelas de caseína. Tal comportamento é atribuído à busca de equilíbrio de forças intermoleculares que minimize a energia livre de Gibbs do sistema, sendo resultante da redução entrópica provocada pela difusão da β-caseína para a fase contínua (Equação 1). A refrigeração conduz ainda a uma solubilização parcial do fosfato de cálcio coloidal (Pierre e Brulé, 1981). Ao conservar o leite a 4° C durante 48 h foi observado aumento de aproximadamente 10 % das concentrações de cálcio e fósforo inorgânico e 20 % da concentração de cálcio iônico (Schmitt et al, 1983; Holt, 1995).

$$dG = dH - Tds \text{ (1) onde:}$$

G = energia livre de Gibbs

H = entalpia

T = temperatura

S = entropia

Em função do conteúdo do presente trabalho, faz-se necessário explicar as mudanças no equilíbrio de sais de fosfato de cálcio causadas pela acidificação do leite. Os íons H^+ , biologicamente liberados ou quimicamente adicionados, protonam espécies solúveis na fase contínua (citrato e fosfato), favorecendo a formação de $HCit^-$ e $H_2PO_4^-$ (Equação 2). Essa mudança causa dissociação dos sais de fosfato de cálcio (Equação 3), de forma que a fase contínua do leite deixa de estar saturada desse sal. Conseqüentemente, essas mudanças induzem a difusão do fosfato de cálcio da fase dispersa em direção à fase contínua (Figure 4, Gaucheron, 2004).

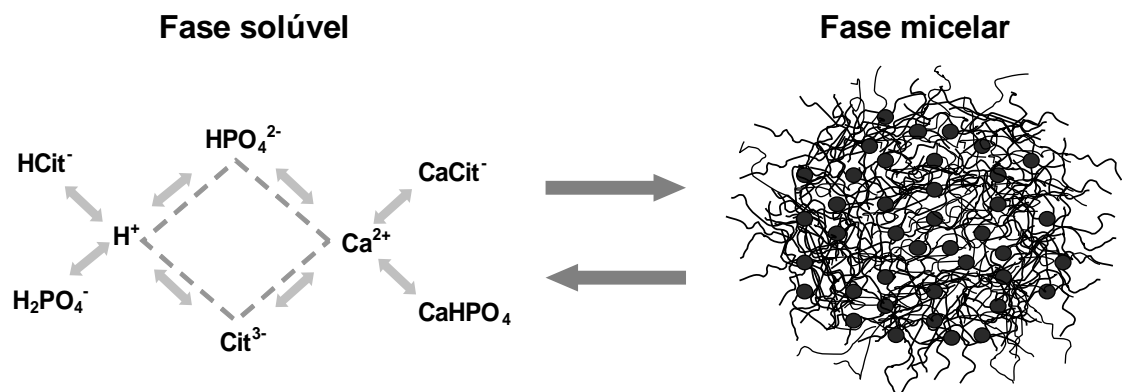
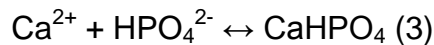
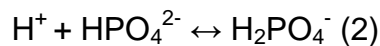


Figura 4 – Equilíbrio de minerais entre as fases solúvel e coloidal/micelar (Gaucheron, 2004).

Quando o pH do leite é reduzido de 6,7 para 6,0, observa-se solubilização de 22 % do cálcio coloidal e 34 % do fósforo coloidal. Continuando a redução do pH de 6,0 para 5,2, o fósforo coloidal é completamente solubilizado ao passo que 72 % do cálcio coloidal difunde para

direção à fase solúvel. Em pH 3,5 todo o cálcio coloidal é solubilizado (Le Graët e Brulé, 1993).

Em um estudo utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) a frio e espalhamento de raio-X a baixos ângulos, Marchin et al. (2007) procuram elucidar detalhadamente a estrutura micelar das caseínas e sua associação com o fosfato de cálcio coloidal durante a acidificação. As micrografias obtidas por MET a frio revelaram pequenas regiões com alta densidade eletrônica, de aproximadamente 2,5 nm, distribuídas homoganeamente por toda estrutura interna das micelas. Essas regiões/inclusões conferem um aspecto granular às micelas de caseína, que é atenuado consideravelmente atenuado quando o pH é reduzido de 6,7 para 5,2. Durante a acidificação realizada nesse estudo, foi possível observar que a integridade estrutural da micela de caseína foi preservada. Por conseguinte, estes resultados demonstraram que o fosfato de cálcio coloidal (ou micelar) está uniformemente distribuído no interior das micelas e que após sua remoção outras forças/interações devem contribuir para a manutenção da organização estrutural.

Horne (2009) sugere que, durante a solubilização do fosfato de cálcio coloidal, há neutralização das cargas negativas oriundas da exposição de resíduos de fosfoserina. Esta neutralização contribui significativamente para a formação de novas interações hidrofóbicas entre as caseínas, possibilitando a manutenção da integridade estrutural. Entretanto, esse mesmo autor salienta que com pH próximo a 5,1 há uma neutralização das cargas superficiais da κ -caseína localizada exterior da micela. Estas cargas originam-se de radicais carboxílicos de resíduos da parte C-terminal (polar) e da ionização do ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) no pH do leite. Com a anulação das cargas superficiais, ocorre uma contração da camada exterior de κ -caseína e, como essa não apresenta a mesma polaridade, pode-se observar a formação de interações de origem hidrofóbicas entre diferentes micelas. Estas interações não são possíveis no pH normal do leite devido à repulsão eletrostática e à estabilização espacial conferida pelas κ -caseínas.

3. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA, Rennes, França) na Unidade Mista de Pesquisa – Ciência e Tecnologia do Leite e do Ovo (UMR – STLO).

3.1 Defosforilação

3.1.1 Defosforilação por via enzimática

A fosfatase alcalina de bezerro ou orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (alkaline optimum) (EC 3.1.3.1, Sigma P7640, Saint Louis, USA) utilizada nesse estudo é uma glicoproteína obtida a partir da membrana de células da mucosa intestinal de bezerros. Ela é encontrada sob forma dimérica, com massa molar de aproximadamente 160 kDa, ligada à no mínimo um carboidrato por monômero. Apresenta especificidade para ésteres de fosfato de álcoois, aminas, pirofosfatos e fenóis. Requer zinco, magnésio ou cálcio como íons divalentes e pode ser utilizada na defosforilação de caseínas ou outras proteínas.

A fosfatase ácida de batata ou orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (acid optimum) (EC 3.1.3.2, Sigma P1146, Saint Louis, USA) catalisa a hidrólise não-específica de mono-ésteres e anidridos de ácido fosfórico, liberando fosfato inorgânico. É uma glicoproteína encontrada sob forma monomérica, com 16,6 % (m/m) de carboidratos e massa molar de 69 kDa. A faixa de pH na qual atua situa-se entre 4 a 7.

A Equação 4 mostra a reação geral catalisada por essas fosfatases.



3.1.1.1. Defosforilação de caseinato de sódio e caseinato de cálcio

Caseinato de sódio em pó (Armor Protéines, França) foi diluído a 25 g de caseína/L (em solução tampão Tris - HCl 15 mM a pH 7,28) e agitado durante 16 h a 37° C a fim de completar a ressuspensão do pó. NaN₃ foi adicionado numa proporção de 0,2 g/L para inibir o desenvolvimento microbiano. Após a agitação, parte da suspensão de caseinato de sódio foi adicionada de solução de CaCl₂ 0,1 M com objetivo de produzir uma suspensão de caseinato de cálcio 5 mM.

A fosfatase alcalina de bezerro (FAL) foi pesada e adicionada às suspensões de caseinato. A relação enzima/substrato foi igual a 0,01 g de enzima por g de caseína. Essas suspensões foram agitadas durante 30 min a 4° C a fim distribuir homoganeamente as enzimas. A defosforilação foi conduzida durante 1, 2, 4, 8 e 20 h a 37 °C. A amostra sem adição das enzimas (controle) foi incubada durante zero e 20 h a 37° C. O pH foi mensurado entre 20 - 25° C após cada tempo de incubação. Em seguida as suspensões de caseinato foram resfriadas a 4° C para cessar a atividade enzimática. As amostras foram analisadas quanto à: turbidez; concentrações de fósforo total (Pt), solúvel (Ps) e orgânico (Po); perfil cromatográfico (HLPC/RP); espectro de massa (ESI/MS). A representação esquemática dos procedimentos utilizando caseinato de sódio e caseinato de cálcio é mostrada na Figura 5.

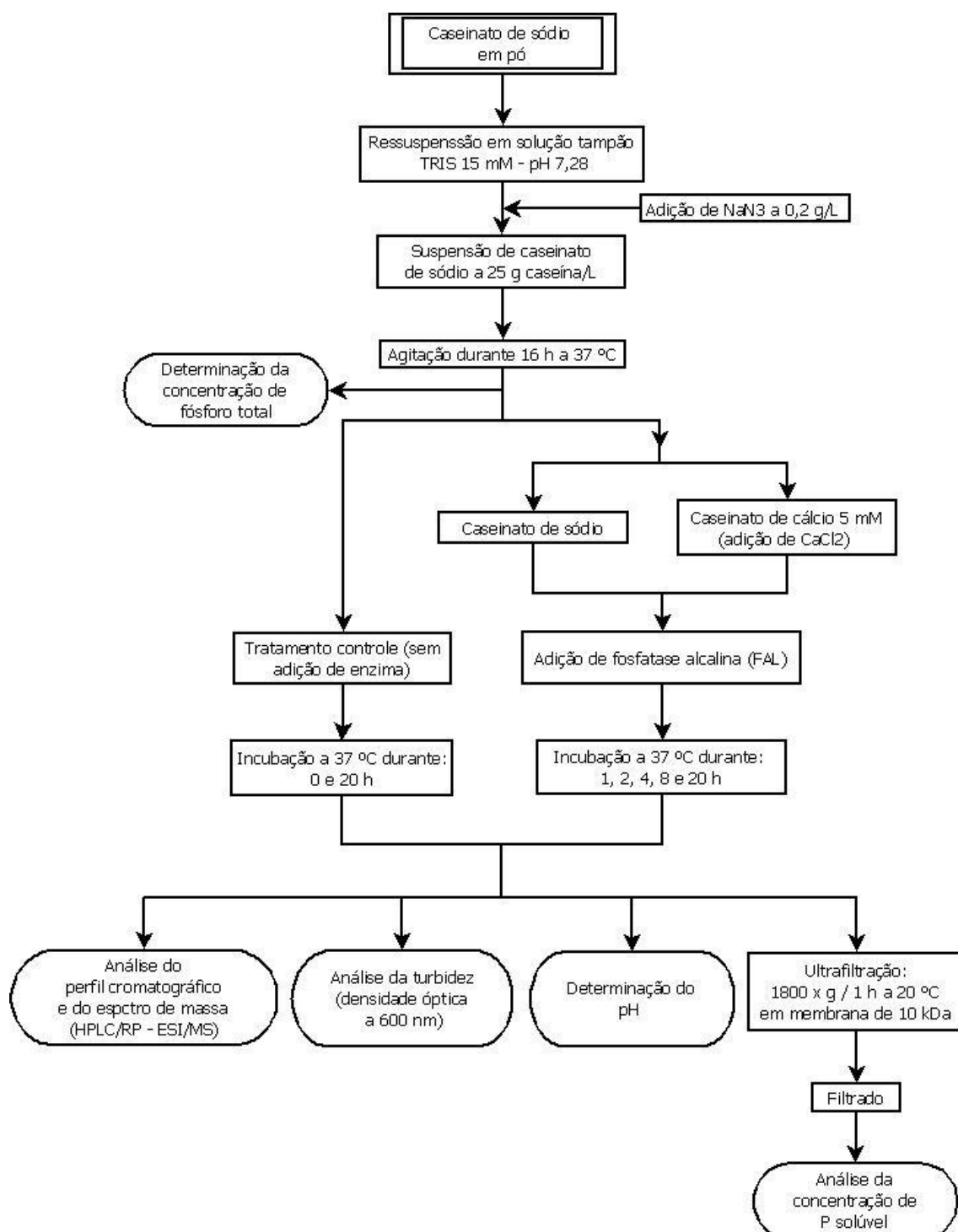


Figura 5 - Esquema geral do experimento de defosforilação utilizando fosfatase alcalina de bezerro em suspensões de caseinato de sódio e de cálcio.

3.1.1.2. Defosforilação em leite UHT desnatado

Leite UHT desnatado (MonoPrix, France) foi utilizado visando evitar a interferência da gordura nos procedimentos analíticos e reações enzimáticas secundárias causadas por enzimas naturais do leite e/ou de origem microbiana.

A defosforilação utilizando fosfatase ácida de batata (FAC) e FAL foi realizada separadamente.

Leite UHT desnatado foi inicialmente adicionado de NaN_3 a 0,2 g/L. As enzimas foram pesadas, adicionadas ao leite e agitadas durante 30 min a 4° C. A relação enzima/substrato foi igual a 0,01 g de enzima por g de caseína no tratamento do leite com FAL enquanto no tratamento do leite com FAC foi 0,0067 g de enzima por g de caseína. A defosforilação foi conduzida durante 1, 2, 4, 8 e 20 h a 37° C. A amostra sem adição das enzimas (controle) foi incubada durante zero e 20 h a 37° C. O pH foi mensurado entre 20 e 25° C após cada tempo de hidrólise. Em seguida as amostras foram resfriadas a 4° C para cessar a atividade enzimática. Posteriormente elas foram analisadas quanto às concentrações de fósforo solúvel (Ps), inorgânico (Pi), orgânico (Po) e total (Pt) e quanto ao perfil cromatográfico e espectro de massa (HPLC/RP – ESI/MS). A representação esquemática dos procedimentos utilizando leite é mostrada na Figura 6.

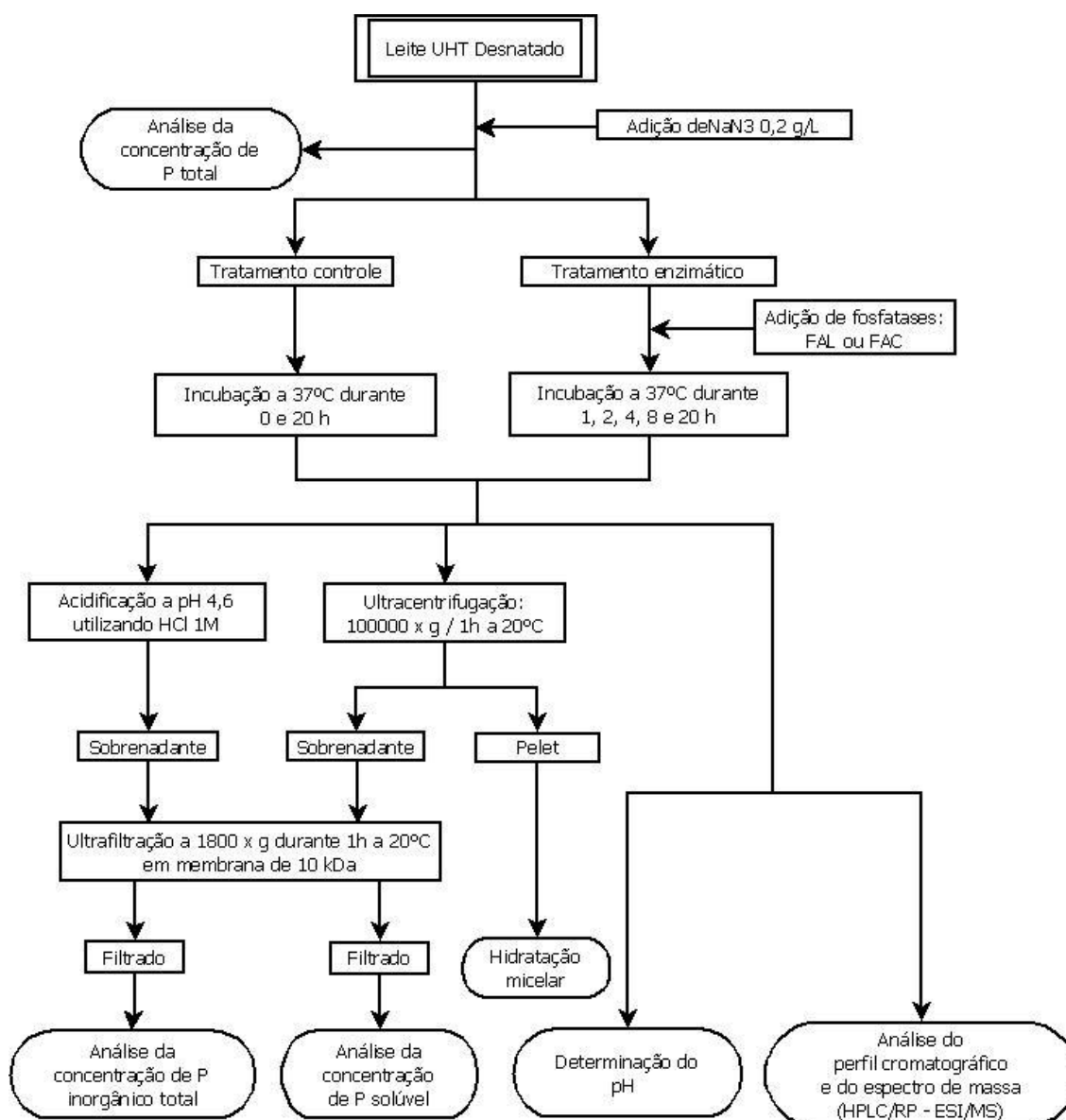


Figura 6 – Esquema geral do experimento de defosforilação utilizando fosfatase alcalina de bezerro e fosfatase ácida de batata em leite esterilizado desnatado.

3.1.2. Defosforilação por acidificação

Leite cru integral foi obtido diretamente da Indústria de Laticínios Entremont Alliance (Montaubain de Bretagne, França). O leite foi duplamente desnatado e uma parte foi separada para a acidificação. O restante foi submetido à ultrafiltração a 45° C em membranas com poros de 0,02 µm.

A fração de leite encaminhada à acidificação foi adicionada de 0,02 g/L de NaN₃ e separada em três frações, sendo duas acidificadas (pH 5,5 e 6,1) utilizando HCl 1 M e uma amostra controle. A amostra acidificada a pH 6,1 e a amostra controle foram proporcionalmente adicionadas de água milliQ a fim de

corrigir a diluição causada pela adição de HCl 1 M. O efeito da diluição foi corrigido na apresentação dos resultados.

Todas as amostras foram agitadas durante 3 h a 25° C a fim de restabelecer o equilíbrio entre fase solúvel e coloidal e ressolubilizar os agregados protéicos formados pelo contato direto entre o ácido e o leite. Após o período de estabilização a 25° C, as amostras foram dialisadas por 65 h a 4° C contra um volume de 50 vezes de ultrafiltrado do leite. Os sachês de diálise (Spectra/Por Membrane 4, Spectra Medical, Canadá) apresentavam faixa de exclusão molecular entre 12 a 14 kDa.

Depois da diálise as amostras foram liofilizadas por 72 h. Os pós obtidos foram ressuspensos a 10% (m/m) em água milliQ contendo 0,2 g/L de NaN₃. As amostras ressuspensas foram agitadas durante 18 h a 25° C e a ausência de agregados foi verificada por granulometria. O pH foi imediatamente mensurado e as frações solúveis foram obtidas por meio de ultrafiltração em membrana de 10 kDa.

Após a etapa inicial de acidificação, as amostras foram analisadas quanto à: pH; concentração total, solúvel e coloidal de Ca e P; matéria nitrogenada total, que engloba as concentrações de nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não protéico (NPN). Posteriormente à ressuspensão dos pós a 10 % (m/m), as amostras foram analisadas quanto à: pH; concentração total, solúvel e coloidal de Ca e P; matéria nitrogenada total (NT, NCN e NPN); cor; distribuição de tamanho; potencial zeta; hidratação micelar; percentual de caseínas sedimentáveis; tempo de coagulação térmica (HCT). Os procedimentos utilizados na defosforilação pela acidificação são mostrados na Figura 7.

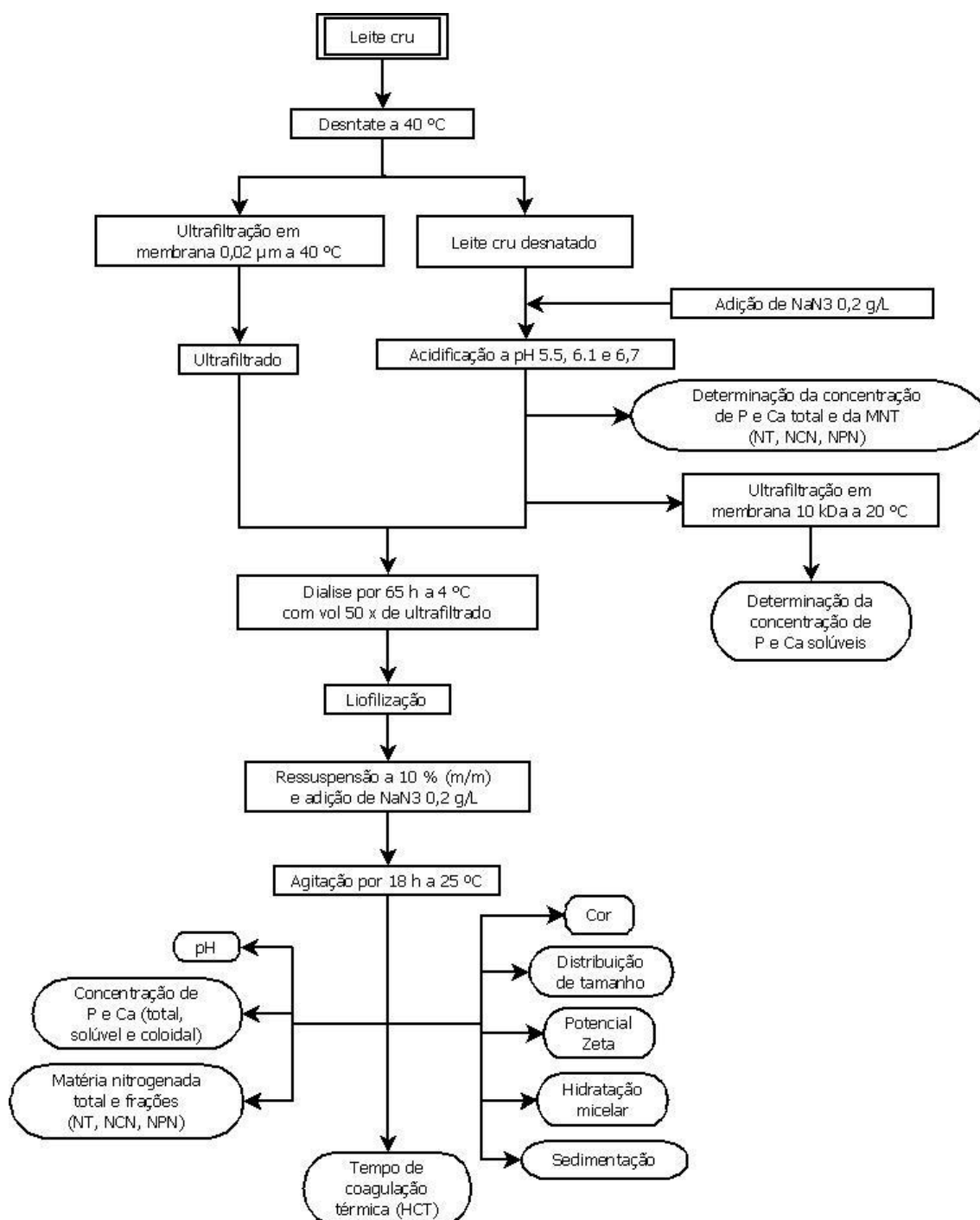


Figura 7 – Esquema geral da defosforilação de leite cru desnatado por via química.

3.2 Análises

3.2.1 Características físico-químicas gerais e bioquímicas

3.2.1.1 pH

Os valores de pH foram mensurados por meio do determinador de pH HI 9024 (Hanna Instruments, Vila do Conde, Portugal) em temperaturas entre 20 e 25° C.

3.2.1.2 Concentração de fósforo

Para determinação da concentração de P solúvel (Ps) as amostras passaram por ultrafiltração em membrana de 10 kDa e a concentração de Ps foi mensurada no ultrafiltrado. A concentração de P inorgânico (Pi) foi determinada em ultrafiltrado (ultrafiltração em membrana de 10 kDa) obtido após acidificação das amostras a pH 4,6 utilizando HCl 1 M.

A concentração de fósforo foi determinada segundo método colorimétrico por via húmida descrito pela Norma FIL Internacional 42B: 1990. Esse método é capaz de mensurar somente fósforo solúvel, havendo a necessidade de submeter as amostras a um processo de mineralização. A mineralização por via húmida envolve a utilização ácido sulfúrico concentrado - densidade 1,84 kg/L, peróxido de hidrogênio 30 % v/v e aquecimento a 400°C. A leitura da absorvância foi mensurada a 820 nm e a concentração de fósforo foi obtida por meio de uma curva padrão utilizando KH_2PO_4 .

3.2.1.3 Concentração de cálcio

A concentração de cálcio foi avaliada por espectrometria de absorção atômica a 422,7 nm, utilizando espectrômetro Tipo Varian AA 300 (Les Ulis, France) segundo o protocolo de Brulé et al. (1974). Cloreto de lantânio foi adicionado às amostras com vistas a eliminar interferências de ordem química, como a formação de elementos refratários. Na análise da concentração de Ca solúvel, as amostras passaram por ultrafiltração em membrana de 10 kDa e a concentração foi mensurada no ultrafiltrado.

3.2.1.4 Nitrogênio total (NT)

Os teores de nitrogênio total (NT) foram obtidos a partir da análise do nitrogênio pelo método de Kjeldahl. A concentração de proteínas foi calculada pela multiplicação do teor de NT por 6,38, de acordo com a norma FIL 20B:1993.

3.2.1.5 Nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não protéico (NPN)

O teor de NCN foi determinado em filtrado obtido a partir de leite acidificado a pH 4,6 utilizando mistura de ácido acético 10 % (v/v) e tampão acetato 1 M. A concentração de NPN foi mensurada em filtrado obtido pela diluição das amostras em volume três vezes maior de TCA 15 % (m/v). Os filtros usados foram Whatman N° 42 e 40 para NCN e NPN, respectivamente. O teor de nitrogênio foi determinado segundo método de Kjeldahl (FIL 20B:1993), sendo convertido para a concentração equivalente de proteínas pelos fatores 6,25 para NCN e 6,19 para NPN.

3.2.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HLPC/RP) acoplada à espectrometria de massa (“electrospray ionization mass spectrometry” – ESI/MS)

• Separação em HPLC/RP

A análise por HLPC/RP acoplada à espectrometria de massa foi baseada nos procedimentos descritos por Léonil et al., (1995), com modificações.

As amostras foram separadas por HLPC/RP (HP-1100, Agilent Technologies, EUA) a 40° C, utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters Symmetry, USA) de 150 x 2,1 mm preenchida com partículas de 5 µm em fluxo de 0,3 mL/min. A separação foi realizada em gradiente de eluição linear usando acetonitrila como modificador orgânico e ácido trifluoroacético (TFA) como tampão volátil. A solução “A” continha 0,106 % de TFA diluído em água milliQ, enquanto a solução “B” apresentava 0,1 % de TFA numa mistura de 80 % de acetonitrila e 20 % de água milliQ.

A fim de promover a dissolução dos agregados protéicos e a redução das proteínas, as amostras foram diluídas num volume cinco vezes maior de solução tampão Tris - HCl 25 mM à pH 7,5 contendo 3,2 M de uréia e 12 mM de ditioneitol, sendo subsequentemente mantidas por 1 h à 37° C. Logo após o período de incubação as amostras foram diluídas num volume duas vezes maior de solução A. Este preparo das amostras conduziu a uma diluição final de 10 vezes e pH 2.

Para a primeira análise cromatográfica, a coluna de fase reversa C18 foi equilibrada com 37 % de solução B seguindo-se a injeção de 100 µmL da

amostra de leite UHT desnatado tempo 0 h (controle sem adição de enzimas e sem incubação). A eluição foi conduzida com as seguintes concentrações da solução B: 0 -5 min, 37 %; 5 – 42,5 min, 57 %; 42,5 – 44 min, 90 %; 44 – 47 min, 90 %; 47 – 48 min, 37 %; 48 – 58 min, 37 %. Entretanto, devido à baixa resolução obtida com esse gradiente, a concentração da solução B foi aumentada e todas as outras amostras foram eluídas de acordo com as seguintes concentrações da solução B: 0 -5 min, 40 %; 5 – 42 min, 60 %; 42 – 44 min, 90 %; 44 – 47 min, 90 %; 47 – 48 min, 40 %; 48 – 57 min, 40 %. Após eluição, os picos foram detectados por espectrometria do UV (214 nm) e analisados por espectrometria de massa (ESI/MS).

• Espectrometria de massa – ESI/MS

Foi utilizado o espectrômetro Perkim Elmer-Sciex (Thornhill, Ontário, Canadá), Modelo API I, quadripólo simples, equipado com alimentação pneumática na fonte de íons (electrospray ion source). Proteínas sob forma iônica, multicarregadas positivamente, foram formadas ao vaporizar soluções através de um capilar de sílica fundida, de 75 µm de diâmetro interno, localizado no interior de um capilar de aço inoxidável submetido a um potencial de 4,8 kV. Um fluxo de ar co-axial ao spray conferiu pressão de 0,3 – 0,4 MPa na injeção das soluções, auxiliando o processo de nebulização.

A interface entre o spray e o analisador de massa consiste em um pequeno orifício cônico com 100 µm de diâmetro submetido a um potencial de 80 V. Uma “cortina” de gás na região da interface, formada por um fluxo contínuo de N₂ (0,8 – 1,2 L/min), previne a entrada de moléculas neutras no espectrômetro de massa e desfaz agregados de íons formados à pressão atmosférica. O espectro de massa das proteínas foi obtido pela média de sinais de múltiplas observações. Cada observação foi adquirida ao longo de uma relação massa/carga (m/z) variando de 800 – 1800, com intervalos m/z de 0,33 e tempo de permanência de 0,5 ms. O número de cargas dos íons multicarregados, o espectro de massa e a massa molar (MM) das proteínas foram obtidos automaticamente utilizando computador Apple Macintosh e software Sciex versão Mac Spec 3.2.

• Combinação HPLC/RP - ESI/MS

O efluente líquido oriundo de HPLC/RP foi dividido por um conector em T de forma que 15 % do fluxo foi injetado na fonte de íons em electrospray e o

restante foi encaminhado ao detector UV. Esse arranjo permitiu o registro paralelo dos sinais de UV e da espectrometria de massa.

Espécies iônicas presentes na solução tampão poderiam suprimir o sinal analítico durante o processo de ionização em “electrospray” e conseqüentemente diminuiriam a sensibilidade de HPLC/RP – ESI/MS. A fim de solucionar esse problema, o eluente cromatográfico foi desviado da fonte de íons durante dois minutos após a injeção, de forma a obter completa eluição de uréia e ditioneitol presentes inicialmente nas amostras.

• Interpretação dos resultados HPLC/RP – ESI/MS

A análise em ESI-MS foi conduzida em modo positivo. Nessas condições, o espectro de uma proteína geralmente consiste de uma série de íons multicarregados, aparecendo numa relação $m/z = (MM + nX)/n$ com intensidades distribuídas de forma Gaussiana; sendo n o número de cargas (normalmente os íons diferem em aproximadamente uma unidade de carga) e X a massa do cátion (H^+ é mais frequente que Na^+ e K^+) (Léonil et al., 1995; Pramanik et al., 2002). As cargas positivas são atribuídas à protonação de resíduos básicos de aminoácidos (Arg, Lys His) e à extremidade α -amino das proteínas, todavia a protonação pode ocorrer com outros resíduos de aminoácidos como Gln ou Asn (Loo et al., 1990).

O espectrômetro de massa foi testado imediatamente antes das análises. Para isso, utilizou-se peptídeo com MM de 1881,23 Da para estado de carga simples, ou MM de 1881,50 para duplo estado de carga, ou seja, 0,25 Da de diferença para cada estado de carga.

As ligações entre as MM obtidas por espectrometria de massa nesse trabalho e o nome das respectivas moléculas de caseína foram baseadas nas publicações de Swaigood, 2003 e Eigel et al., 1984. Estes autores calcularam a MM de cada caseína baseando-se na sequência primária de aminoácidos.

3.2.2 Características físico-químicas

3.2.2.1 Cor

A intensidade da coordenada L^* foi mensurada em colorímetro tristímulus Minolta chromameter CR-300 (Carrières-sur-Seine, França). A calibração foi realizada com placa de calibração Minolta (valores tri-estimulares

padrão: $Y = 92,4$; $x = 0,3161$; $y = 0,3325$). L^* definiu a posição da amostra no eixo claro-escuro (Kneifel et al., 1992; Gaucher et al., 2007).

3.2.2.2 Turbidez

A turbidez ou densidade óptica (OD600) das suspensões de caseinato foi mensurada a 600 nm numa célula de 1 x 1cm utilizando espectrofotômetro KONTRON UVIKON 922 (Buckinghamshire, UK). Os valores apresentados são médias de determinações sucessivas. Quando a OD600 foi superior a 1, as amostras foram diluídas em água destilada e o fator de diluição foi considerado na apresentação dos resultados.

3.2.2.3 Distribuição de tamanho e potencial zeta

A distribuição de tamanho e o potencial Zeta (carga) foram mensurados em granulômetro Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). As amostras foram diluídas dez vezes em ultrafiltrado de leite obtido por membrana de 10 kDa e estabilizadas por 30 min a 25° C antes das análises. Baseado em experimentos anteriores, a viscosidade do ultrafiltrado (meio dispersante) foi fixada em $0,99 \times 10^{-3}$ Pa.s.

Distribuição do tamanho: o índice de refração do meio dispersante foi fixado em 1,342 e o das micelas de caseína em 1,44. A distribuição do tamanho foi determinada em triplicata, sendo que para cada replicata foram realizadas 14 corridas em média.

Potencial zeta: as amostras foram submetidas à voltagem de 50 V e o índice de refração do meio dispersante foi fixado em 1,342. A carga negativa das caseínas foi determinada com base na mobilidade eletroforética. A mobilidade eletroforética foi mensurada por um velocímetro a laser, baseado no efeito Doppler, que é parte integrante do Zetasizer Nano ZS. Utilizando a equação de Henry (Equação 5) foi possível converter a mobilidade eletroforética em potencial Zeta. A análise foi realizada em triplicata, sendo que para cada replicata foram realizadas 17 corridas em média.

$U_e = \frac{2 \epsilon \zeta f (ka)}{3 \eta}$ (5), onde:

$$3 \eta$$

U_e = mobilidade eletroforética

ϵ = constante dielétrica do meio

ζ = potencial zeta

η = viscosidade do meio dispersante

$f(Ka)$ = função de Heryny

3.2.2.4 Hidratação micelar

A hidratação das micelas de caseína foi calculada após ultracentrifugação das amostras a 100000 x g durante 1 h a 20 °C (Ultracentrífuga Beckman L-8-55, Gagny, France). Os pellets obtidos foram drenados, pesados, conduzidos à secagem a 103 °C durante 7 h e pesados novamente. A hidratação micelar corresponde à diferença entre as massas do pellet antes e após secagem, dividida pela massa do pellet seco. O resultado é expresso como g de água por g de caseína (Gaucher et al. 2007).

3.2.2.5 Percentual de sedimentação das caseínas

O percentual de sedimentação das caseínas foi definido como a relação, expressa em porcentagem, entre a quantidade de material sedimentado e a quantidade total de amostra sujeita a ultracentrifugação a 100000 x g durante 1 h a 20 °C (Ultracentrífuga Beckman L-8-55, Gagny, France).

3.2.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi definida como o tempo necessário ao aparecimento de separação visual de fases numa temperatura crítica, no caso a 140° C. Para o teste de estabilidade térmica, 6 mL de amostra foram colocadas em tubos Pirex hermeticamente fechados, e foram aquecidas em placa aquecedora com temperatura ajustada para 140° C.

4. Resultados e discussão

4.1. Defosforilação por via enzimática

4.1.1 Caseinato de sódio e caseinato de cálcio

Nesse trabalho, as suspensões de caseinato de sódio e cálcio foram abreviadas para CN-Na e CN-Ca, respectivamente.

4.1.1.1 pH

O pH da amostra CN-Na foi próximo ao pH da amostra controle ao longo do tempo de incubação (Figura 8), apresentando uma diferença de somente 0,08 unidades no tempo 20 h. O pH da amostra CN-Ca diminuiu 0,2 unidades logo após a adição da solução de CaCl_2 . Essa diminuição está ligada à forte afinidade das caseínas por íons bivalentes, o que resulta numa troca entre íons H^+ previamente associados às caseínas e íons cálcio que foram adicionados à suspensão de caseinato. (Gaucheron et al. 1996 e 1997). Posteriormente, o pH do tratamento CN-Ca manteve-se estável, com redução de 0,06 unidades no tempo 20 h em relação a seu valor inicial (Figura 8). A estabilidade do pH em ambas as amostras era esperada devido ao uso de solução tampão (Tris – HCl 15 mM). Não foram encontrados estudos sobre o comportamento do pH em função do tempo de defosforilação devido, possivelmente, à utilização de soluções tampão para diluição de caseinato (Linden e Lorient, 1976; Bigham et al., 1976; Lorenzen e Reimerdes, 1992; Hiller e Lorenzen, 2009).

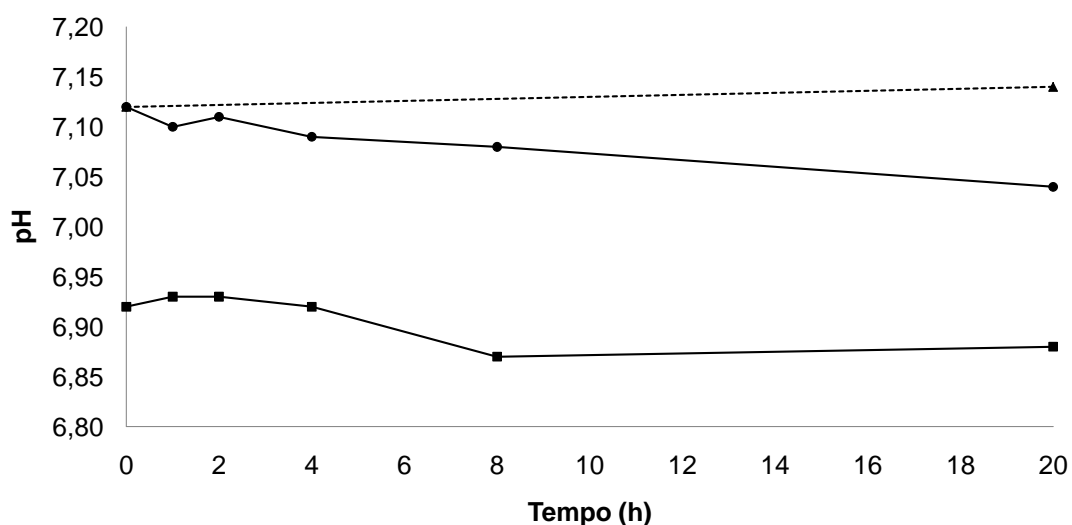


Figura 8 – Comportamento do pH em função do tempo de incubação a 37° C das amostras de caseinato de sódio (CN-Na) (●) e caseinato de cálcio (CN-Ca) (■) tratadas fosfatase alcalina de bezerro, e CN-Na (controle) (▲).

4.1.1.2 Concentração de fósforo

A concentração de fósforo total (Pt) foi igual a 6,05 mM. Levando em consideração a concentração das principais caseínas no leite e suas respectivas concentrações de aminoácidos fosforilados (Swaigood, 2003 e

Eigel et al., 1984), a concentração teórica de fósforo numa suspensão de caseinato a 25 g de caseína L⁻¹ é aproximadamente 6,5 mM. Porém, Ward e Bastian (1998) observaram perda de grupos fosfatos durante os procedimentos de fabricação de caseinato em pó. Logo, a concentração de fósforo em suspensão de caseinato pode ser inferior à esperada.

A concentração inicial de fósforo solúvel (Ps) foi 0,67 mM (Figura 9A) e pode ser considerada como de origem residual. A fabricação de caseinato é baseada na precipitação das caseínas após acidificação de leite desnatado a pH 4,6. Depois da acidificação, o coágulo é submetido a sucessivas etapas de diálise com que removem a fase solúvel do leite. Todavia, quando as etapas de lavagem não são devidamente controladas, é possível encontrar compostos solúveis como lactose e fosfato em quantidades relevantes (Walstra, 2006).

A concentração de Ps em função do tempo de incubação está apresentada na Figura 9A. É possível observar uma rápida elevação da concentração de Ps em ambas as amostras com FAL durante a primeira hora de incubação. A concentração de Ps da amostra CN-Na aumentou ligeiramente entre 1 e 2 h de incubação e depois estabilizou-se. Entretanto, a concentração de Ps do tratamento CN-Ca manteve-se relativamente constante após a primeira hora de incubação. Uma elevada taxa de defosforilação durante os primeiros 60 - 120 min de incubação, seguida de estabilização, foi observada por vários autores independentemente do tipo de fosfatase (ácida ou alcalina) (Zittle e Bingham, 1959; Bingham et al., 1976; Lorenzen e Reimerdes, 1992). Bingham et al. (1976) apontam a retro-inibição de fosfatase como a causa do término da defosforilação após os 60 – 120 minutos iniciais. Lorient e Linden (1976) argumentam que além da retro-inibição, há impedimento estérico causado pela agregação das caseínas, uma vez que esses autores observaram que as caseínas isoladas são defosforiladas mais rapidamente que as caseínas na forma de caseinato.

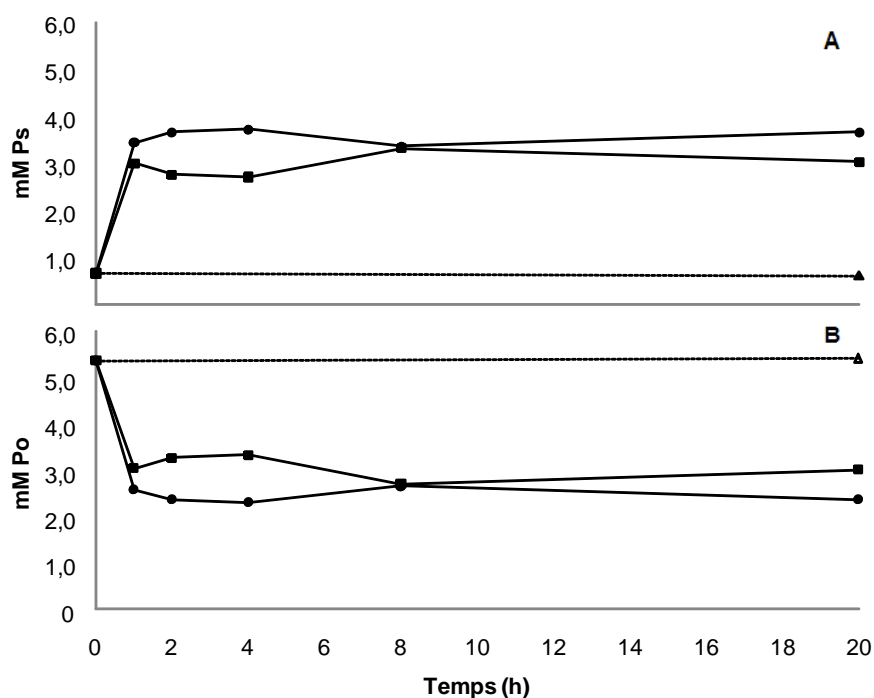


Figure 9 – Concentração de fósforo solúvel (Ps) (A) e fósforo orgânico (Po) (B) em função do tempo de incubação das amostras de caseinato de sódio (CN-Na) (●) e caseinato de cálcio (CN-Ca) (■) tratadas fosfatase alcalina de bezerro (■) e CN-Na (controle) (▲).

A concentração de fósforo orgânico (Po) apresentou comportamento necessariamente inverso à concentração de Ps (Figura 9B), uma vez que no caso de caseinato ela é obtida pela diferença entre as concentrações de Pt e Ps. Ao considerar a concentração inicial de Po da amostra controle como 100%, observa-se que a defosforilação atingiu aproximadamente 56 % na amostra CN-Na e 39 % na amostra CN-Ca após 2 h de incubação. Ohmiya et al. (1983) observaram uma influência negativa do cálcio na defosforilação de caseinato, a qual foi atribuída a um impedimento estérico causado pela formação de um complexo entre Ca^{2+} e caseínas.

4.1.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HLPC/RP) acoplada à espectrometria de massa (ESI/MS) - HPLC/RP – ESI/MS

A análise em HPLC/RP – ESI/MS foi aplicada somente à amostra CN-Na devido ao maior nível de defosforilação. Foi observada uma diferença média de 8,8 Da (~0,04%) entre a MM teórica e a experimental das caseínas. Os perfis cromatográficos das amostras controle de caseinato de sódio, sem incubação e

incubada por 20 h, foram similares (Figura 10A e 10B). Foram identificadas κ -caseína A-1P com MM de 19047 Da (região 1), κ -caseína B-1P com MM 19016 Da (região 2), α_{s1} -caseína B-8P com MM 23627 Da (região 3), β -caseína A²-5P com MM 23995 Da e β -caseína A¹-5P com MM 24034 Da (região 4).

A análise da amostra de CN-Na tratada com FAL mostrou que houve proteólise das caseínas (Figura 10C). Somente foram identificados peptídeos com MM compreendida entre 2912 e 13506 Da. Na região 1 foi observado um pico contendo duas espécies que sugerem a atuação da fosfatase. As MM de 12616 e 12458 Da apresentam uma diferença de 158 Da que pode originar-se da perda de dois grupos fosfatos, pois ao usar ESI-MS, espera-se uma redução de 80 Da na MM, para cada grupo fosfato removido (Hirschberg et al., 2004; Molina et al., 2007). Contudo, diante da presença de enzimas proteolíticas contaminantes, não é possível saber se essa diferença é oriunda da defosforilação ou da proteólise ao acaso.

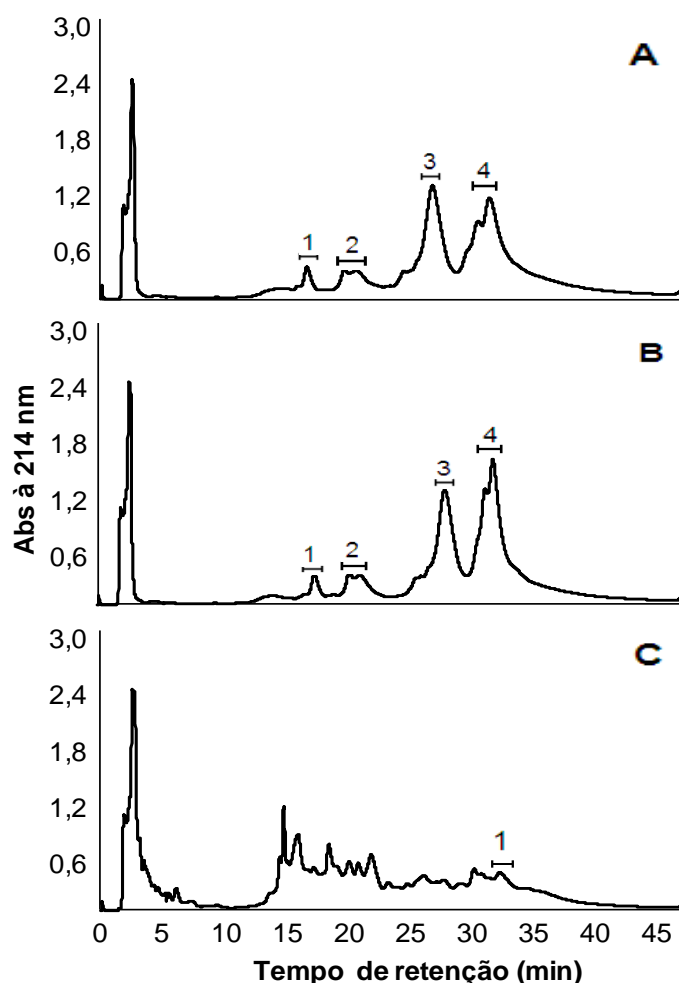


Figura 10 – Perfil cromatográfico de suspensões de caseinato de sódio sem incubação (Fig. 10A), incubada durante 20 h na ausência de fosfatase alcalina de bezerro (Fig. 10B), e durante 20 h na presença de fosfatase alcalina de bezerro (Fig. 10C).

Molina et al. (2007) utilizaram fosfatase ácida de batata (Sigma, Saint Louis, USA) para pesquisar o efeito da defosforilação em caseinato de sódio e em padrões de α_{s1} e β -caseínas. Os perfis cromatográficos e os espectros de massa (HPLC/RP – ESI/MS) de α_{s1} e β -caseína foram complexos, com proteólise evidente após incubação a 37° C na ausência de fosfatase por 1 a 8 h, contudo não foi informado o tempo no qual foram obtidos esses resultados. Porém, quando os mesmos substratos (padrões de α_{s1} e β -caseínas) foram adicionados de fosfatase e incubados nas mesmas condições, curiosamente não foi observado proteólise. O espectro de massa dessas amostras revelou apenas a perda de grupos fosfatos. Não foram apresentados resultados da espectrometria de massa para o caseinato, o que não permitiu a comparação com os resultados desse trabalho.

4.1.1.4 Turbidez (densidade óptica a 600 nm – OD600)

A turbidez de todas as amostras aumentou ao longo do tempo de incubação, porém, a taxa de elevação foi diferente entre elas (Figura 11). A turbidez da amostra CN-Ca tratada com FAL apresentou aumento pronunciado na primeira hora de incubação, enquanto na amostra CN-Na tratada com FAL a elevação foi mais intensa nas primeiras duas horas. Conforme demonstrado anteriormente (item 4.1.1.2), a defosforilação das amostras CN-Ca e CN-Na pela FAL ocorreu nos primeiros 60 e 120 min, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com resultados de Ohmiya et al. (1983) sobre a influência negativa do cálcio na defosforilação, devido ao impedimento espacial dos sítios de atuação das fosfatases. Porém, não é possível afirmar que o aumento da turbidez, na presença ou não de cálcio, esteja vinculado somente à defosforilação, uma vez que a análise em HPLC/RP – ESI/MS demonstrou a atuação de enzimas proteolíticas contaminantes.

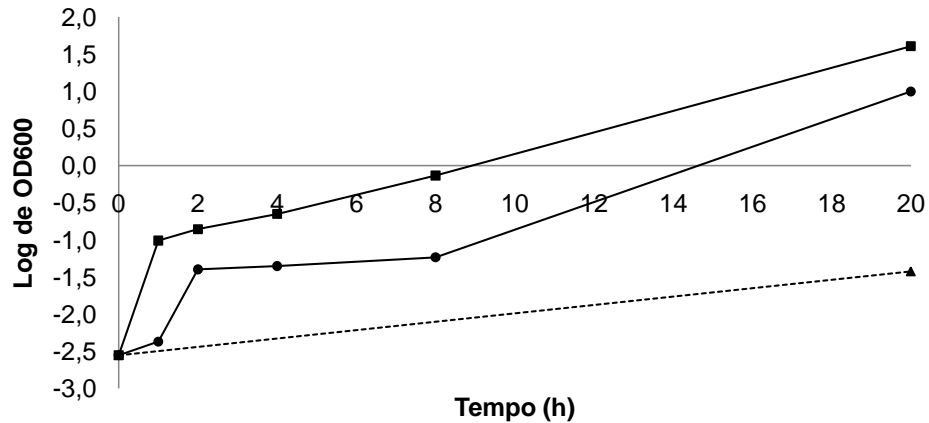


Figure 11 – Log dos valores de turbidez determinados por densidade óptica a 600 nm em função do tempo de incubação das amostras de CN-Na (●) e CN-Ca (■) tratadas FAL, e CN-Na (controle) (▲).

4.1.2 Leite UHT desnatado

4.1.2.1 pH

Conforme demonstrado na Figura 12, os valores de pH de todas as amostras permaneceram estáveis durante o período de incubação. As amostras tratadas com FAL e FAC apresentaram ligeira queda no pH ao longo do período de incubação, entretanto essa queda foi inferior a 0,06 unidades no tempo 20 h. O pH inicial do leite de 6,67 está de acordo com dados amplamente divulgados na literatura (Fox, 2003; Walstra, 2006).

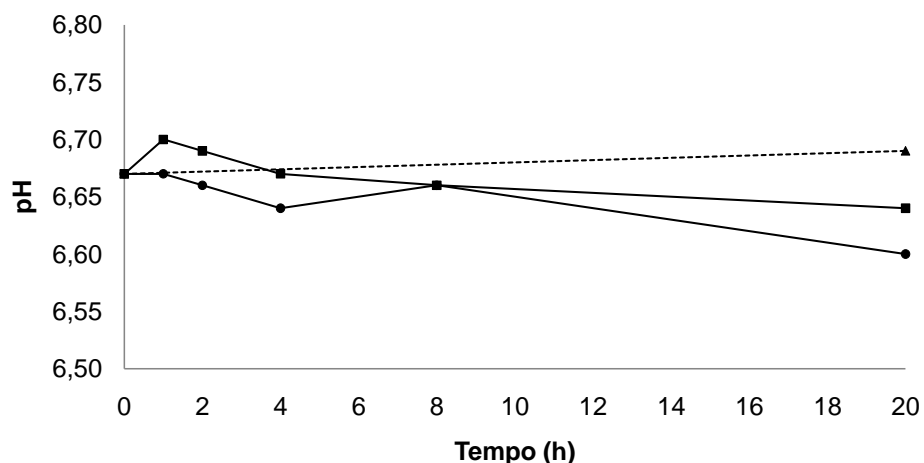


Figura 12 – Comportamento do pH em função do tempo de incubação a 37° C das amostras de leite esterilizado desnatado tratadas com fosfatase alcalina de bezerro (■), fosfatase ácida de batata (●) e controle (▲).

4.1.2.2 Concentração de fósforo

A concentração de P total do leite foi 27,5 mM e a de Pi foi 19,2 mM. Ambas foram coerentes com a literatura (Fox e McSweeney, 1997; Holt e Jenness, 1984). As amostras tratadas com FAL e FAC demonstraram comportamento semelhante quanto ao aumento da concentração de Pi, atingindo 22,6 e 22,4 mM, respectivamente, após 20 h de incubação. A amostra controle também apresentou aumento na concentração de Pi, chegando a 20,4 mM (Figura 13A).

A concentração de Po é mostrada na Figura 13C. Considerando a concentração inicial de Po do leite como 100 %, os percentuais de defosforilação após 20 h de incubação foram 31,9 % para a amostra tratada com FAL, 36,9 % para a amostra tratada com FAC e 14,6 % para a amostra controle. A diminuição da concentração de Po da amostra controle não era esperada. Como não foram realizadas repetições não é possível saber se essa defosforilação é real.

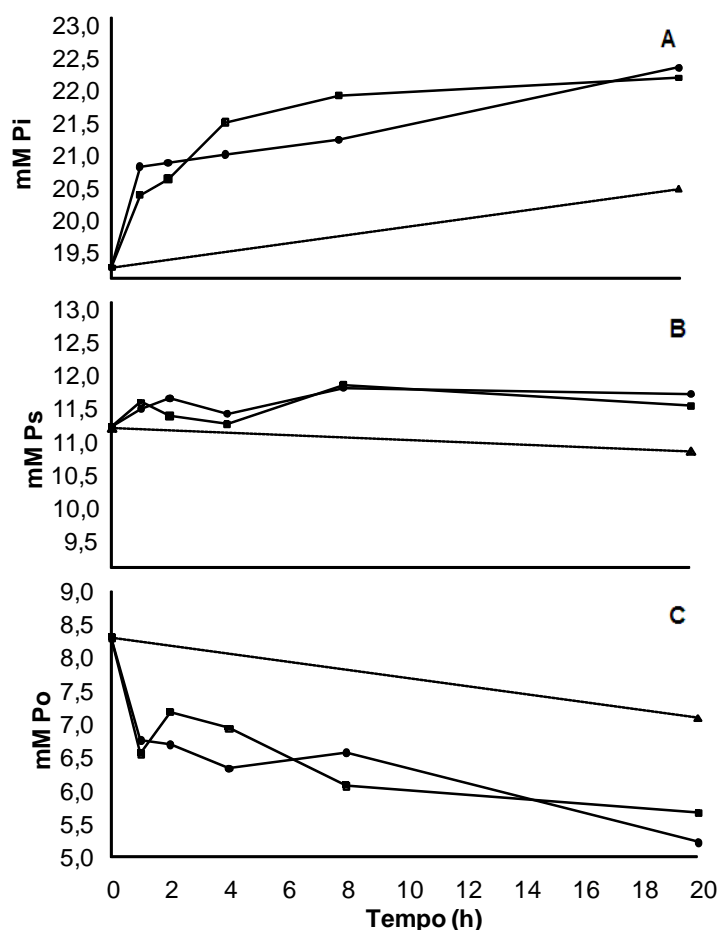


Figura 13 - Concentração de fósforo inorgânico (Fig. 13A), fósforo solúvel (Fig. 13B) e fósforo orgânico (Fig. 13C) em função do tempo de incubação das amostras de leite esterilizado desnatado tratadas com fosfatase alcalina de bezerro (■), fosfatase ácida de batata (●) e controle (▲).

Lorient e Linden (1976) empregaram fosfatase alcalina de leite, com MM de 80 kDa, na defosforilação de caseínas sob a forma de micelas. As micelas de caseína foram obtidas por ultracentrifugação do leite, seguida de ressuspensão do pellet em solução tampão livre de fosfato. O percentual de defosforilação foi 4,3 % após 2 h de incubação a 37° C. Os autores atribuíram o baixo nível de defosforilação à existência de pontes de fosfato de cálcio coloidal que dificultam o acesso das fosfatases aos resíduos fosfosserínicos. Esses autores descartaram a possibilidade da fosfatase alcalina ser excessivamente grande para penetrar na micela com base nos resultados apresentados por Ribadeau-Dumas e Gamier (1970), que demonstraram que a Carboxipeptidase A, com massa molar de 40 kDa, conseguia remover

quantitativamente resíduos carboxílicos terminais das frações α , β , e κ -caseínas em micelas nativas.

A concentração de Ps das amostras tratadas com FAL e FAC aumentou ao longo do período de incubação, enquanto que a concentração de Ps da amostra controle manteve-se estável (Figura 13B). Uma vez que a fase contínua do leite em pH 6,7 é saturada em fosfato de cálcio (Holt, 2003), era esperado que após a hidrólise dos grupos fosfato pelas fosfatases, os mesmos difundissem em direção à fase dispersa. Deste modo, embora discreto, o aumento da concentração de fósforo na fase solúvel pode não estar relacionado à defosforilação e sim à liberação de peptídeos ainda fosforilados. Caso o aumento da concentração de Ps seja considerado de origem proteolítica, os percentuais de defosforilação no tempo 20 h seriam reduzidos para 26,9 % para a amostra tratada com FAL, e 31 % para a amostra tratada com FAC.

4.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (HLPC/RP) acoplada à espectrometria de massa (ESI/MS) - HPLC/RP – ESI/MS

A título de exemplo, são apresentados o espectro de massa obtido por corrente total de ionização (CTI) (Figura 14A) e o perfil cromatográfico obtido por UV (Figura 14B) da análise de leite UHT desnatado incubado por 20 h a 37° C. Os perfis cromatográficos detectados por ambos os métodos foram qualitativamente similares. A intensidade de alguns picos é diferente porque as técnicas são baseadas em diferentes propriedades físicas. A detecção no UV é sensível a cromóforos e ligações peptídicas absorvendo a 214 nm, ao passo que a espectrometria de massa é sensível à diversas variáveis como composição do solvente, número de resíduos básicos, condições de dessolvatação no spray, etc (Bourcier et al., 1994; Léonil et al., 1995).

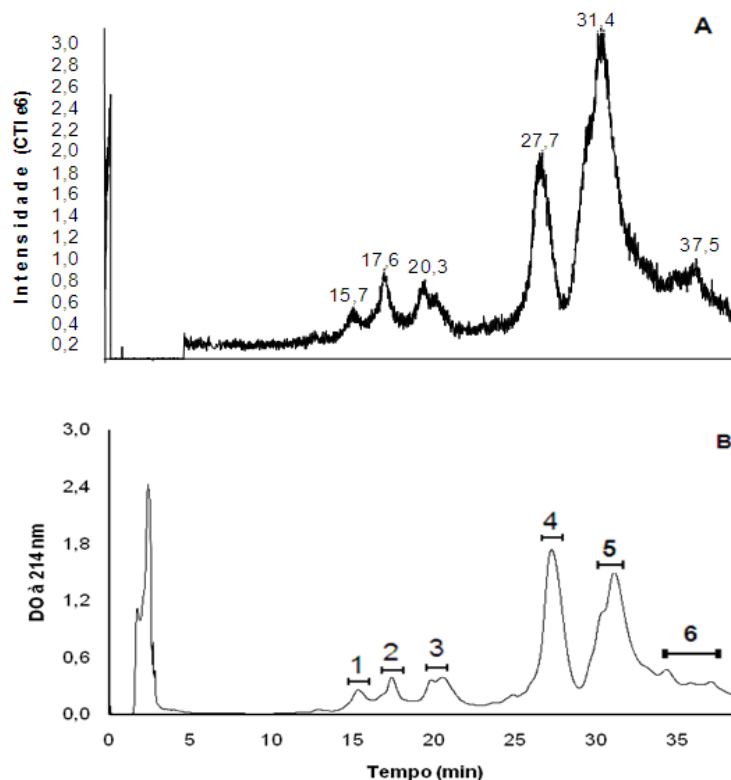


Figura 14 - Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa acoplada à espectrometria de massa de leite esterilizado desnatado incubado durante 20 h a 37° C. Os picos cromatográficos (marcados de 1 a 6) foram detectados por corrente total de ionização (Fig. 14A) e por absorvância (Abs ou DO) no UV à 214 nm (Fig. 14B).

A análise do perfil cromatográfico e do espectro de massa de leite UHT desnatado apresentou resultados similares para a amostra sem incubação e para a amostra incubada por 20 h a 37° C na ausência de fosfatases (Figura 15A e 15B, respectivamente). Embora as espécies identificadas sejam as mesmas, os tempos de retenção observados na segunda amostra injetada foram mais curtos, fato que ocorreu em função da mudança no gradiente de eluição.

Nesse trabalho foi observada uma diferença média de 6 Da (~0,02%) entre a MM teórica e a experimental das caseínas. As regiões 1 e 6 das Figuras 15A e 15B não tiveram seus picos identificados por ESI/MS. A região 2 apresentou um único pico, no qual foram identificadas κ -caseína A-1P (MM 19046 Da) e κ -caseína A-1P + lac, com MM igual a 19371 Da (aumento de 324 Da correspondente à uma molécula de lactose). A região 3 apresentou dois

picos, no primeiro pico foi identificada κ -caseína B-1P (MM 19014 Da) e no segundo κ -caseína B-1P + lac (MM 19339 Da). Na região 4, foram identificadas duas espécies, α_{s1} -caseína B-8P (MM 23626 Da) e α_{s1} -caseína B-8P + lac (MM 23950 Da). Na região 5 foram identificados três picos, β -caseína A²-5P (MM 23995 Da), β -caseína A²-5P + lac (MM 24318 Da) e β -caseína A¹-5P (MM 24034Da).

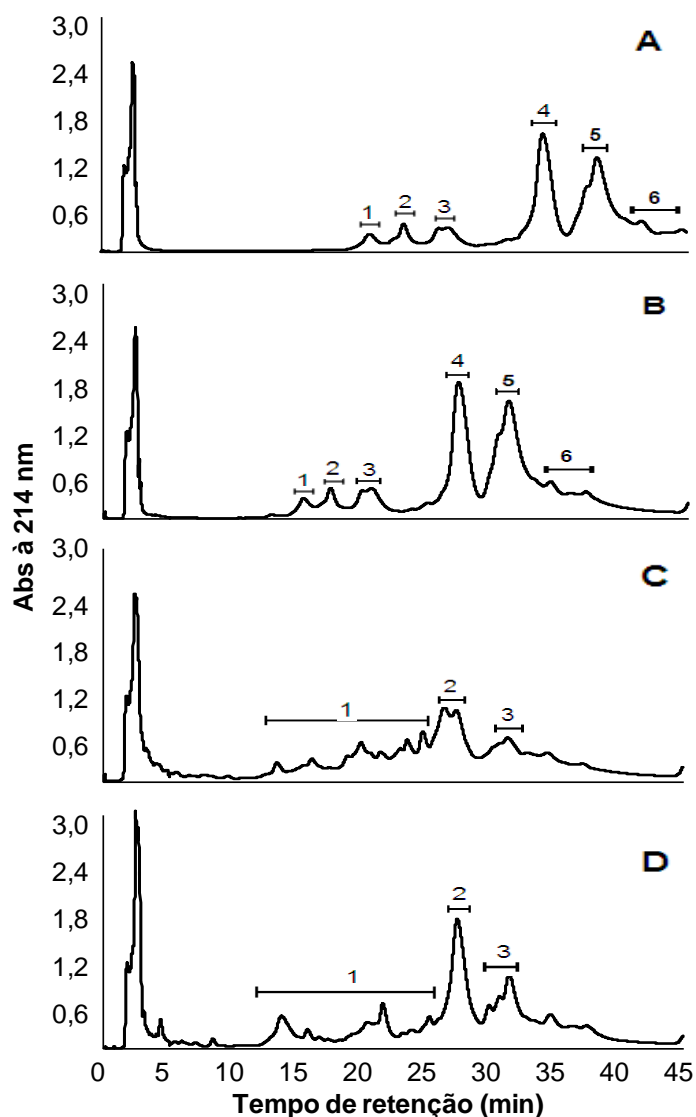


Figura 15 – Perfil cromatográfico de leite esterilizado desnatado (Fig. 15A), leite esterilizado desnatado incubado durante 20 h a 37 °C na ausência de fosfatase (Fig. 15B) e durante 20 h na presença de fosfatase alcalina de bezerro (Fig. 15C) e fosfatase ácida de batata (Fig. 15D).

As MM das formas não lactosiladas de α_{s1} , β e κ -caseína estão de acordo com resultados de Farrel et al. (2004) e Bonizzi et al. (2009). O

aumento de 324 Da nas MM das caseínas também foi observado por Scaloni et al. (2002) em leite UHT e por Steffan et al. (2006) em caseínas aquecidas a 80° C na presença de lactose, e foi atribuído por ambos os autores à adição de uma molécula de lactose via reação de Maillard.

Gaucher et al. (2008) averiguou o efeito da temperatura de estocagem nas características físico-químicas de leite UHT semi-desnatado. O perfil cromatográfico do leite UHT semi-desnatado recém processado foi semelhante ao encontrado nesse trabalho. A região 6 da Figura 15A e 15B desse trabalho é similar ao pico correspondente à β -lactoglobulina observado por esses autores. Nenhum “pico” correspondente à α -lactoalbumina foi identificado em ambos os estudos.

O tratamento do leite UHT desnatado com FAL demonstrou a atuação de enzimas proteolíticas (Figura 15C), não havendo identificação de κ -caseína. A região 1 apresentou vários picos, com peptídeos de MM entre 2109 e 7381 Da. Na região 2, foram identificadas α_{s1} -caseína B-8P (MM 23627 Da) e uma espécie com MM de 23439, a qual não foi associada especificamente à nenhuma caseína. Na região 3 foram identificadas β -caseína A²-5P (MM 23995 Da), β -caseína A²-5P + lac (MM 23418 Da) e β -caseína A¹-5P (MM 24031Da) e ainda uma outra espécie com Mm 23658 Da que pode ser resultado da perda de quatro grupos fosfatos de β -caseína A²-5P (diferença de 337 Da).

O tratamento de leite UHT desnatado com FAC também demonstrou a atuação de enzimas proteolíticas (Figura 15D). Na região 1 foi possível identificar peptídeos com Mm entre 4027 e 14296 Da. Um único pico foi observado na região 2, correspondente à α_{s1} -caseína B-8P (Mm 23627 Da). A região 3 apresentou três picos distintos, porém no primeiro deles não foi identificada nenhuma espécie. Nos outros dois picos foram identificadas β -caseína A²-5P (Mm 23995 Da) e β -caseína A¹-5P (Mm 24035Da). Não foram observados sinais de defosforilação por FAC.

Com base nos resultados apresentados para o tratamento de leite UHT desnatado com FAL e FAC, sugere-se duas possibilidades para a defosforilação de caseínas. Uma dessas possibilidades é que a MM das enzimas FAL e FAC não inviabilizaram seu acesso ao interior das micelas de caseína e que o envolvimento dos resíduos fosfoserínicos na formação de fosfato de cálcio coloidal não impediu a defosforilação. Contudo, após verificar

proteólise em ambas as amostras adicionadas de FAL e FAC, à defosforilação pode também ter ocorrido nos peptídeos fosforilados liberados para fase contínua do leite.

4.1.3 Conclusão parcial – defosforilação por via enzimática

A falta de padronização na determinação do percentual de defosforilação em estudos com fosfatase deve ser revista pela comunidade científica. A grande maioria dos autores, que promoveram a defosforilação de caseínas, determinou o percentual de defosforilação com base na concentração de fósforo em precipitados obtidos por acidificação (Zittle e Bingham, 1959; Yamuchi et al., 1967; Ohmiya et al., 1983; Li-Chan e Nakai, 1989; Van Hekken e Strange, 1993 e 1994; Molina et al., 2007). Entretanto, as concentrações/proporções finais de ácido foram arbitrárias e inferiores àquelas preconizadas pela Federação Internacional de Lácteos para a determinação de nitrogênio não protéico (NPN). Dessa forma, caso haja proteólise secundária, como observado nesse trabalho, a determinação da defosforilação pode não ser precisa por não considerar a perda de fósforo na forma de peptídeos ainda fosforilados. Nesse contexto, a apreciação de propriedades funcionais (Pearse et al., 1986; Lorenzen e Remerdes, 1992; Van Hekken e Strange, 1993 e 1994; Hiller e Lorezen, 2009) pode ter seu valor científico prejudicado.

Ao examinar o perfil cromatográfico e o espectro de massa (HPLC/RP – ESI/MS) das suspensões de caseinato e do leite, foi detectada proteólise em todas as amostras incubadas com fosfatase. Tendo consciência que ambas as fosfatases estavam contaminadas por enzimas proteolíticas, não justificaria continuar o experimento de defosforilação, pois não poderíamos estimar adequadamente o efeito da perda de fosfato nas características das micelas de caseína. Os resultados de hidratação micelar das amostras de leite UHT desnatado não foram apresentados devido à essa constatação. Deste modo, manteve-se o objetivo geral do trabalho, porém modificou-se a forma de defosforilação, que passou a ser de origem química, por acidificação.

4.2 Defosforilação por acidificação

Os resultados da defosforilação por via química são apresentados em duas seções. A primeira parte trata das características físico-químicas gerais

do leite, incluindo o efeito da acidificação sobre o equilíbrio de minerais. A segunda parte corresponde à caracterização das amostras após diálise, liofilização e ressuspensão a 10 % (m/m). Nesta etapa, são elucidados os efeitos da defosforilação sobre as características físico-químicas gerais e características coloidais das amostras defosforiladas. O tempo de coagulação térmica foi avaliado na segunda parte do trabalho. Todos os procedimentos estão descritos na Figura 7.

4.2.1 Caracterização físico-química do leite e distribuição de minerais entre as fases contínua e dispersa durante a acidificação

As características físico-químicas do leite, apresentadas na Tabela 7, estão em conformidade com literatura amplamente difundida na área (Fox e McSweeney, 1998; Fox, 2003; Walstra, 2006; Fox, 2009).

Tabela 7 – Características físico-químicas gerais do leite utilizado na defosforilação por via química.

Características	Valores
pH	6,71
Proteínas totais (% m/m)	3,51
NCN x 6,25 (% m/m)	0,84
NNP x 6,19 (%m/m)	0,20
Ca total (mM)	32,51
P total (mM)	28,74
P inorgânico (mM)	23,10
P orgânico (mM)	5,64

Em relação a amostra controle, a acidificação do leite a pH 6,10 causou aumentos de 25,4 e 50,1 % na concentração de P e Ca solúveis, respectivamente. Continuando a acidificação até pH 5,50, o aumento da concentração de P solúvel atingiu 56,7 %, enquanto o aumento da concentração de Ca solúvel alcançou 130,5 % (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração de P e Ca solúvel de acordo com pH do leite. Os respectivos percentuais de solubilização de P e Ca também são apresentados.

	P		Ca	
	mM P solúvel	solubilização (%)	mM Ca solúvel	solubilização (%)
pH 6,71	10,96	0	7,96	0
pH 6,10	13,75	25,4	11,95	50,1
pH 5,50	17,18	56,7	18,35	130,5

Esses resultados foram similares aos encontrados por Dalglish e Law (1989) e Brulé e Le Graet (1993) sobre a solubilização do Ca e P em função do pH. Todavia, devido à relação não-linear entre o pH e a solubilização de Ca e P, os resultados obtidos não foram apresentados na forma de gráfico, pois os três valores de pH analisados não são suficientes para descrever tal relação. Segundo Gaucheron (2004), os íons H^+ , biologicamente liberados ou quimicamente adicionados, protonam espécies solúveis na fase contínua, como citrato e fosfato, favorecendo a formação de $HCit^-$ e $H_2PO_4^-$. Essa mudança causa dissociação dos sais de fosfato de cálcio, de forma que a fase contínua do leite deixa de estar saturada desse sal. Consequentemente, essas mudanças induzem a difusão do fosfato de cálcio da fase dispersa em direção à fase contínua.

No processo de acidificação do leite, há solubilização de outros íons além do P, como Ca, Mg e citrato (Le Graët e Gaucheron, 1999). Logo, o processo de defosforilação aqui utilizado, pode ser igualmente chamado de desmineralização. Como o termo desmineralização é mais apropriado para explicar os fenômenos descritos nesse experimento, ele será doravante utilizado.

4.2.2 Características físico-químicas gerais das amostras após diálise, liofilização e ressuspensão a 10 % (m/m)

Os valores de pH das três amostras foram similares após a ressuspensão a 10 % (m/m) (Tabela 9) e podem ser considerados normais (Fox e McSweeney, 1998; Fox, 2003; Fox, 2009). Ao avaliar os percentuais de matéria nitrogenada (proteínas totais, NCN, NPN), foi observado um aumento de aproximadamente 10 % da concentração em relação aos valores iniciais do

leite (Tabela 9). Contudo, esse aumento da concentração não alterou o pH das amostras desmineralizadas, o que é atribuído ao poder tampão do leite (Lucey et al., 1993).

Tabela 9 – Valores de pH e matéria nitrogenada (total, NCN e NPN) das amostras após a desmineralização.

	LR* pH 6,71	LR* pH 6,10	LR* pH 5,50
pH	6,67	6,66	6,64
Proteínas totais (% m/m)	3,86	3,85	3,86
NCN x 6,25 (% m/m)	0,96	0,94	0,93
NNP x 6,19 (%m/m)	0,22	0,22	0,23

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

A composição em P e Ca das amostras desmineralizadas estão apresentadas na Tabela 10. Apesar do aumento da concentração de sólidos, as concentrações totais de P e Ca diminuíram. Essa diminuição está vinculada ao aumento da solubilidade do fosfato de cálcio a 4° C (Pierre e Brulé, 1981). Schmitt et al. (1983) e Holt, (1995) descreveram aumento das concentrações de P e Ca solúveis de aproximadamente 10 % após resfriamento do leite a 4° C durante 48 h. Davies e Law (1983) observaram que o equilíbrio inicial do fosfato de cálcio entre as fases solúvel e coloidal é restabelecido quando o leite é incubado por 18 h a 20° C. Porém como as amostras deste experimento foram dialisadas por 65 h a 4° C e a liofilização foi realizada em seguida, não houve condições para que o fosfato de cálcio solubilizado devido à baixa temperatura retornasse para a fase dispersa.

Tabela 10 – Concentrações total e solúvel de P e Ca do leite após defosforilação.

Amostras	P (mM)			Ca (mM)			[Ca/P]
	Total	Solúvel	Coloidal	Total	Solúvel	Coloidal	coloidal
LR* pH 6,7	27,49	12,60	9,25	28,63	8,35	20,28	2,19
LR* pH 6,1	25,71	12,37	7,70	24,49	8,14	16,35	2,12

LR* pH 5,5 22,86 12,14 5,08 18,90 7,68 11,22 2,21

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

Inicialmente, o objetivo da desmineralização por via química foi remover parcialmente o fosfato de cálcio coloidal do interior das micelas de caseína. Dessa forma é mais lógico evidenciar os percentuais de desmineralização com base na redução das concentrações de P e Ca coloidal após as etapas de diálise, liofilização e ressuspensão. Ao tomar a amostra controle como referência, foi observada diminuição da concentração de P coloidal de 16,8 e 45,1 % e de Ca coloidal de 19,4 e 44,7 % para as amostras que foram inicialmente acidificadas a pH 6,1 e 5,5, respectivamente.

Já foi demonstrado que as micelas de caseína são afetadas de diversas formas pelo pH e pela temperatura. Quando o pH do leite é diminuído de seu valor natural, o fosfato de cálcio coloidal começa a se solubilizar (Van Hooydonk et al., 1986; Chaplin, 1984). Sabendo-se que o fosfato de cálcio coloidal contribui significativamente para a manutenção da integridade micelar (Pyne e McGann, 1960; McGann e Pyne, 1960), a relação entre as concentrações molares de Ca e P coloidal ([Ca/P]_c) é amplamente utilizada para explicar fenômenos que ocorrem com as micelas de caseína no leite (Holt et al., 1986; Griffin et al., 1988, Dalglish e Law, 1988 e 1989; Holt, 2004). A relação [Ca/P]_c do leite antes da desmineralização foi 2,02, a qual está dentro da faixa de $2,03 \pm 0,05$ descrita por Holt (2004). Porém, ao analisar a Tabela 10, é possível constatar que as amostras desmineralizadas, inclusive a amostra controle, mostraram uma relação [Ca/P]_c mais elevada que o leite.

Ambas as concentrações de P e Ca solúveis apresentaram tendência de diminuição em função do avanço da desmineralização. A explicação para esse fenômeno não é evidente, e seriam necessárias repetições do experimento para verificar a persistência desse comportamento.

4.2.3 Características físico-químicas das amostras após diálise, liofilização e ressuspensão a 10 % (m/m)

4.2.3.1 Cor

O leite desnatado é branco devido à dispersão de luz pelas micelas de caseína. Esse efeito é atribuído à dimensão coloidal das micelas e à sua elevada concentração no leite (Holt, 2003; Horne, 2009). O valor L* da amostra controle (70,35) está em conformidade com a literatura disponível (Phillips et al., 1995; Gaucher et al., 2007, Faka et al., 2009). O valor L* da amostra inicialmente acidificada a pH 6,1 e da amostra controle foram próximos (Tabela 11). Porém, a desmineralização reduziu a brancura da amostra inicialmente acidificada a pH 5,5 (valor L* de 60,95), de forma que essa amostra podia ser visualmente distinguida das outras.

A diminuição da brancura do leite desnatado está associada à desestruturação das micelas de caseína, por exemplo, quando o fosfato de cálcio coloidal é solubilizado pela adição de EDTA (Visser et al. 1986; Griffin et al., 1988) ou quando uréia é adicionada ao leite (McGann e Fox, 2004).

Tabela 11 – Valores de L* das amostras de leite após a desmineralização.

Amostras	Valor L*
LR* pH 6,7 (pH 6,67)	70,35
LR* pH 6,1 (pH 6,66)	68,53
LR* pH 5,5 (pH 6,64)	60,94

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

4.2.3.2 Distribuição de tamanho

A Figura 16 mostra uma única população de partículas para as três amostras. De acordo com a descrição de Fox (2008), essa população pode ser atribuída às micelas de caseína, uma vez que engloba partículas com diâmetro variando de 50 – 500 nm.

O diâmetro médio da amostra controle foi 185 nm e o da amostra inicialmente acidificada a pH 6,1 foi 182 nm. A amostra inicialmente acidificada a pH 5,5 apresentou o menor diâmetro médio, de 171 nm. Apesar das diferenças entre as amostras, os valores encontrados estão de acordo com vários trabalhos publicados, segundo os quais o diâmetro médio das micelas pode variar de 120 a 200 nm (De Kruif, 1998; McMahon e McManus, 1998; Dalgleish et al, 2004; Fox, 2008; McMahon e Oommen, 2008). Esses

resultados indicam que a desmineralização não influencia na distribuição de tamanho e no diâmetro médio das micelas de caseína.

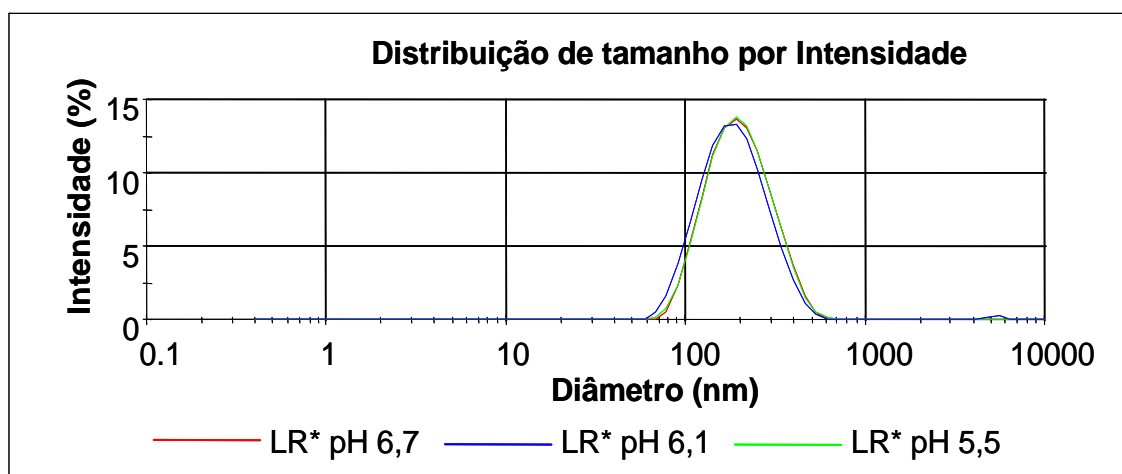


Figura 16 – Distribuição de tamanho das micelas de caseína de acordo com a intensidade.

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

4.2.3.3 Potencial Zeta

As cargas negativas das micelas de caseína estão relacionadas à presença de grupos carboxílicos e ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) na parte c-terminal das moléculas de κ -caseína (Horne, 2009). Segundo De Kruif e Holt (2003) essas cargas conferem potencial zeta de aproximadamente -20 mV e são essenciais à estabilidade das micelas.

A diminuição do potencial zeta está associada à adição de cátions, como cálcio (Dalgleish et al., 1984) e sódio (Huppertz e Fox, 2006), ao aumento da concentração do leite (Huppertz e Fox, 2006), à hidrólise da κ -caseína (Gastaldi et al., 2003) e à acidificação (Visser et al., 1986). De acordo com Horne (2009) a coagulação do leite por acidificação ocorre somente após a neutralização das cargas negativas das micelas. Por outro lado, a remoção de cálcio iônico do leite causa o aumento do potencial zeta (Grimley, H. J. et al., 2010). A Tabela 12 apresenta os valores do potencial zeta das amostras desmineralizadas.

Tabela 12 – Potencial Zeta das micelas de caseína após a defosforilação.

Amostras	Potencial zeta (mV)
LR* pH 6,7 (pH 6,67)	- 15,3
LR* pH 6,1 (pH 6,66)	- 14,3
LR* pH 5,5 (pH 6,64)	- 13,9

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

Foi observada uma tendência de diminuição do potencial zeta na medida em que a desmineralização foi mais intensa. Todavia, esses valores são próximos entre si, e estão abaixo do valor médio de – 20 mV, descrito por Gastaldi et al., (2003), De kruif e Holt (2003), Rabiller-Baudry et al., (2005), Bouzid et al., (2008). A diferença entre os valores de potencial zeta encontrados neste trabalho com os valores da literatura e a tendência de diminuição do desses valores em função da desmineralização necessita de repetições para ser confirmada, uma vez que esses valores foram próximos entre si e com os dados da literatura.

4.2.3.4 Hidratação Micelar

As micelas de caseína são estruturas altamente hidratadas devido a alguns fatores como a característica hidrofílica das frações caseínicas (Walstra, 2006), a elevada porosidade das micelas de caseína (Ribadeau-Dumas e Garnier (1970) e a existência de uma camada superficial de κ -caseína carregada negativamente (Walstra, 1979). Contudo a hidratação micelar não apresenta valor único, encontrando-se valores entre 2 a 2,9 g H₂O g⁻¹ caseína, de acordo a com a técnica utilizada (Horne, 2009). Os valores de hidratação micelar de todas as amostras foram similares (Tabela 13).

Tabela 13 – Hidratação micelar das amostras após defosforilação.

Amostras	g H ₂ O/g de caseína
LR* pH 6,7 (pH 6,67)	2,36
LR* pH 6,1 (pH 6,66)	2,33
LR* pH 5,5 (pH 6,64)	2,34

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

Os valores de $\sim 2,3 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ de caseína são próximos dos valores encontrados por Philippe et al., (2005) e Gaucher et al. (2007), porém são inferiores aos valores encontrados por Gastaldi et al. (2003) e Guillaume et al. (2004) e superiores aos valores encontrados por Visser et al. (1986). Segundo Raouche et al. (2007) essas diferenças são ocasionadas pela utilização de distintas combinações força da gravidade/tempo/temperatura, assim como pelas características individuais das ultracentrífugas. A observação da Tabela 13 permite sugerir que desmineralização das micelas de caseína não influenciou os valores de hidratação micelar.

4.2.3.5 Percentual de sedimentação

Ao analisar a Tabela 14, é possível observar uma relação negativa entre a desmineralização e a massa de caseínas sedimentáveis. A redução relativa do percentual de caseínas sedimentáveis foi de 22 % para a amostra acidificada inicialmente a pH 6,1 e 53 % para a amostra acidificada inicialmente a pH 5,5.

Holt et al. (1986) observou que a diálise do leite contra solução tampão livre em fosfato e com a mesma concentração de cálcio livre, força iônica e pH do leite, causa diminuição da massa de caseínas sedimentáveis. Os autores atribuíram essa diminuição à dissolução parcial das micelas de caseínas.

Tabela 14 - Percentual de caseínas sedimentáveis das amostras defosforiladas.

Amostras	Sedimentação (%)	Redução relativa** (%)
LR* pH 6,7 (pH 6,67)	8,10	0
LR* pH 6,1 (pH 6,66)	6,34	22
LR* pH 5,5 (pH 6,64)	3,83	53

*LR = leite reconstituído a 10 % (m/m) após diálise e liofilização das amostras acidificadas a pH 5,50, 6,10 e 6,71 (amostra controle).

** A redução relativa foi definida como o percentual de redução da massa de caseínas sedimentáveis em relação à amostra controle.

4.2.4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica é uma técnica importante para avaliar a capacidade de o leite resistir à coagulação em temperaturas de esterilização. Todas as amostras desmineralizadas foram estáveis por mais de 1 h a 140° C.

5. Conclusões e perspectivas

A defosforilação de caseínas sob a forma de caseinato atingiu níveis mais elevados que sob a forma micelar. Porém, a defosforilação por fosfatase alcalina de bezerro em caseinato foi influenciada negativamente pela presença de 5 mM de cálcio.

A defosforilação em leite esterilizado UHT desnatado por fosfatase alcalina de bezerro e fosfatase ácida de batata ocorreu devido a duas possibilidades plausíveis. Uma dessas possibilidades é que a MM das enzimas FAL e FAC não inviabilizaram seu acesso ao interior das micelas de caseína e que o envolvimento dos resíduos fosforínicos na formação de fosfato de cálcio coloidal não impediu a defosforilação. Contudo, após verificar proteólise em ambas as amostras adicionadas de FAL e FAC, a defosforilação pode também ter ocorrido nos peptídeos fosforilados liberados para fase contínua do leite.

Foi demonstrado que as fosfatases utilizadas nesse estudo estavam contaminadas por enzimas proteolíticas. Tal contaminação não permitiria o conhecimento preciso das consequências da defosforilação sobre a organização estrutural das micelas de caseína e sobre as propriedades funcionais de produtos lácteos. Esta constatação levou ao fim dos experimentos com fosfatase.

Os resultados da desmineralização das micelas de caseína indicam que as características como potencial zeta, tamanho médio, distribuição de tamanho e hidratação micelar não foram influenciadas. Por outro lado a cor e o percentual de caseínas sedimentáveis diminuíram com o avanço da desmineralização. Esses resultados sugerem que, nas amostras desmineralizadas, as caseínas estavam presentes como uma mistura de caseinato e micelas de caseína. À medida que a desmineralização foi mais intensa, a proporção de micelas diminuiu.

As propriedades funcionais de produtos lácteos fabricados a partir de leite contendo caseínas sob as formas de micelas e caseinato ainda não foi estudada. Deste modo, os resultados encontrados nesse trabalho abrem horizonte para a busca de produtos lácteos com características inovadoras. A alteração das propriedades reológicas de géis obtidos por coagulação ácida e/ou enzimática, e a capacidade de formação e estabilidade de espumas e emulsões são possibilidades interessantes a serem estudadas.

Referências Bibliográficas

A

Annan, W. D., W. Manson, 1969. **Journal of Dairy Research**, 36, 259 - 268.

B

Beau, M., Bourgain, C., 1926. L'industrie Fromagère, **La Science Fromagere**. Paris: J.B. Bailliere et fils.

Beau, M. 1932a. La Caséine, **published by the author**. 61 Boulevard des Invalides, Paris.

Beau, M. 1932b. Nouvelle théorie concernant l'action de la pression sur la caséine du lait. **Le Lait**, 12, 618 –640.

Beau, M. 1941. Le caséine et la pression. **Le Lait**, 21, 113 – 137.

Berzelius, J. J. 1814. Uber Thierische Chemie. Schweiggers **Journal fur Chemie Physik**, 11, 261–280.

Bingham, E. W., Farrel, H. M., Dahl, K J. 1976. Removal of phosphate groups from casein with potato acid phosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 429, 448 – 460.

Bonisch, M. P., Heidebach, T. C., Kulozik, U. 2008. Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. **Food Hydrocolloids**, 22, 288- 297.

Bonizzi, I., Buffoni, J. N., Feligini, M. 2009. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. **Journal of Chromatography A**, 1216, 165 – 168.

Bourcier, S., Hoppilliard, Y. Kargar, T. **Spectra Analyse**, 178, 29 – 37.

Braconnet, H. 1830. Mèmoire sur le Caseum et sur Le Lait: Nouvelles ressources qu'ils peuvent offrir à la société. **Annales de Chimie et Physique**, 43, 337 – 351.

Brulé, G., Maubois, J. L., et Fauquant, J. (1974) Etude de la teneur en éléments minéraux des produits obtenus lors de l'ultrafiltration du lait sur membrane. **Lait**, 54, 600 - 615.

D

Dalgleish, D. G., Law, A. J. R. 1988. pH-Induced dissociation of bovine casein micelles. Analysis of liberated caseins. **Journal of Dairy Research**, 55, 529 – 38.

Dalgleish, D. G., Law, A. J. R. 1989a. pH-Induced dissociation of bovine casein micelles II. Mineral solubilization and its relation to casein release. **Journal of Dairy Research**, 56, 727 – 735.

Dalgleish, D. G., Horne, D. S., Law, A. J. R. 1989b. Size-related differences in bovine casein micelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, 991, 383 – 87 .

Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., Goff, H. D., 2004. A possible structure of the casein micelle based on high resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, 14, 1025 – 31.

Davies, D. T. White, J. C. D. 1960. The use of ultrafiltration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous phase and dispersed phases. **Journal of Dairy Research**. 27, 171-196.

Davies, D. T., Law, A. J. R. 1983. Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. **Journal of Dairy Research**, 50, 67 – 75.

De Kruif, C. G. 1998. Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation. **Journal of Dairy Science**, 81, 3019 – 3028.

De Kruif, C. G., Holt C. 2003. Casein micelle structure, functions, and interactions, em: **Advanced Dairy Chemistry - 1. Proteins. Part A**, pp. 233–270. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

De la Fuente, M. A., Fontecha, J., Juarez, M. 1996. Partition of main and trace minerals in milk: effect of ultracentrifugation, rennet coagulation, and dialysis on soluble phase separation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 1988 - 1992.

Dickinson, E. (1992). **An introduction to food colloids**. Oxford Science Publications. Oxford, UK.

Doi, H., Kawaguchi, N., Ibuki, F., Kanamori, M. 1979. Susceptibility of κ -casein components to various proteases. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. Tokyo , 25 , 33 – 41 .

Donnelly, W. J., McNeill, G. P., Buchheim, W., McGann, T. C. 1984. A comprehensive study of the relationship between size and protein composition in natural bovine casein micelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, 789, 136 – 143.

E

Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrel, H. M., Harwalkar, V. R., Jenness, R., Whitney R. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. **Journal of Dairy Science**, 67, 1599 – 1631.

F

Faka, M., Lewis, M. J., Grandison, A. S., Deeth, H. 1998. The effect of free Ca concentration on the heat stability and other characteristics of low-heat skim milk powder. **International Dairy Journal**, 19, 386 – 392.

Farrell, H. M., Jimenez-flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-kwai-hang, K.F., Swaisgood, H.E. (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision . **Journal of Dairy Science**, 87, 1641-1674.

Farrell, H. M. Jr, Malin, E. L., Brown, E. M., Qi, P. X. 2006. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 11, 135 – 47.

FIL (Fédération Internationale de Laiterie), 1990. **Norme FIL Internationale 42B:1990**. Lait: Détermination de la teneur en phosphore total (méthode spectrométrique).

Fox, P. F. 1982. Heat-induced coagulation of milk. Em: Fox P. F., **Developments in Dairy Chemistry**, Vol 1. Applied Science Publications Ltd, London UK.

Fox, P. F., McSweeney P. H. L., 1998. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. First Edition. Blackie Academic & Professional, London, UK.

Fox P. F. 2003. Milk proteins: general and historical behaviour, em: Fox P. F., McSweeney P. L. H., (editores). **Advanced dairy chemistry**. 3rd edn. Proteins, Vol. 1. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

Fox, P. F., Brodkorb, A. 2008. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**. 18, 677– 684.

Fox, P. F. 2009. Milk: an overview em: **Milk proteins: from expression to food**, pp. 1 – 54. Editado por Thompson A., Boland M., Singh H. Elsevier Inc. New Zealand.

G

Gastaldi, E., Trial, N., Guillaume, C., Bourret, E., Gontard, N., Cuq, J. L. 2003. Effect of controlled k-casein hydrolysis on rheological properties of acid milk gels. **Journal of Dairy Science**, 86, 704 – 711.

Gaucher, I., Piot, M., Beaucher, E., Gaucheron, F. 2007. Physico-chemical characterization of phosphate-added skim milk. **International Dairy Journal**, 17, 1375 - 1383.

Gaucher, I., Mollé, D., Gagnaire, V., Gaucheron, F. 2008. Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. **Food Hydrocolloids**, 22, 130 – 143.

Gaucheron, F., Famelart, M. H., Le Graet, Y. 1996. Iron-supplemented caseins: preparation, physicochemical characterization and stability. **Journal of Dairy Research**, 63, 233 - 243.

Gaucheron, F., Le Graet, Y., Boival, E., Piot, M. 1997. Binding of cations to casein molecules: importance of physico-chemical conditions. **Milchwissenschaft**, 52, 322 – 327.

Gaucheron, F. 2004. **Minéraux et Produits Laitiers**. Tec & Doc, Paris, France.

Gaucheron, F. 2005. The minerals of milk. **Reproduction Nutritional Development**. 45, 473 - 483.

Griffin, M. C. A., Lyster, R. L. J., Price, J. C. 1988. The disaggregation of calcium-depleted casein micelles. **European Journal of Biochemistry**, 174, 339 – 343.

Grimley, H. J., Grandison, A. S., Lewis, M. J. 2010. The effect of calcium removal from milk on casein micelle stability and structure. **Milchwissenschaft Milk Science International**, 65, 151 – 154.

H

Hiller, B., Lorenzen, P. C. 2009. Effect of phosphatase/transglutaminase treatment on molar mass distribution and techno-functional properties of sodium caseinate. **Lwt – Food Science and Technology**, 42, 87 -92.

Holland J. W., 2009. Post-translation modifications of caseins. Em: **Milk proteins: from expression to food**. pp. 107 – 132. Editado por Thompson A., Boland M., Singh H. Elsevier Inc. New Zealand.

Holt, C., Dalgleish, D. G., Jenness, R. 1981. **Analytical Biochemistry**, 113, 154 – 163.

Holt, C., Davies D. T., Law, A. J. R. 1986. Effects of colloidal calcium phosphate content and free ion calcium concentration in the milk serum on the dissociation of bovine casein micelles. **Journal of Dairy Research**, 53, 557 – 572.

Holt, C. 1992. Structure and stability of casein micelles. **Advances in Protein Chemistry**, 4, 63 – 151.

Holt, C. (1997) The milk salts and their interaction with casein. Em: **Advanced Dairy Chemistry**, Volume 3, Lactose, Water, Salts and Vitamins, 2^o ed. pp. 233-256. Editado por Fox P.F., Chapman & Hall, London, UK.

Holt C., De Kruif C.G., Tuinier R., Timmins P.A., 2003. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. **Colloids Surf. A**. 213, 275 – 284.

Holt, C. 2004. Biophysique des sels et de la micelle de caséine, em : **Minéraux et Produits Laitiers**. pp 113 -150, Editado por Gaucheron, F. Tec & Doc, Paris, France.

Horne, D. S. 1998. Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. **International Dairy Journal**, 8, 171 – 77.

Horne, D. S. 2002. Casein structure, self assembly and gelation. **Current Opinion Colloid Interface Science**. 7, 456 – 461.

Horne, D. S. 2006. Casein micelle structure: models and muddles. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 11, 148 – 53.

Horne, D. S., 2009. Casein micelle structure and stability, em: **Milk proteins: from expression to food**. pp. 133 – 162. Editado por Thompson A., Boland M., Singh H. Elsevier Inc. New Zealand.

Huppertz, T., C. G. de Kruif. 2008. Structure and stability of nanogel particles prepared by internal cross-linking of casein micelles. **International Dairy Journal**, 18, 556-565.

I

IDF (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION) 1993. **20B:1993**: milk: determination of nitrogen content. Brussels, 11 f.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), 1997. **Compendium of chemical terminology**. Vol. 1994, 66, 1169. 2nd ed. <http://www.iupac.org/goldbook/S06153.pdf>. Acessado em 02 fevereiro de 2010.

K

Kastle, J. H., Roberts, N., 1909. The chemistry of milk, em: **Milk and its relation to public health, Washington**, DC, USA: Bulletin N^o. 56, Hygienic Laboratory, Treasury Department, Governement Printing Office. pp. 315 – 423.

L

Le Graët, Y., Brulé, G. 1993. Les équilibres minéraux du lait: influence du pH et de la force ionique. **Le Lait**. 73, 51 - 60.

Le Graët, Y., Gaucheron, F. pH-induced solubilization of minerals from casein micelles : influence of casein concentration and ionic strength. **Journal of Dairy Research**, 66, 215 – 224.

Léonil, J., Mollé, D., Gaucheron, F., Arpino, P., Guénot, P., Maubois, J. L. 1995. Analysis of major bovine milk proteins by on-line high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Le Lait**, 75, 193 – 210.

- Li-Chan, E., Nakai, S. 1989. Enzymic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula. **Journal of Dairy Research**, 56, 381 – 390.
- Linderstrom-Lang, K. 1929. Casein. III The fractionation of casein. **Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg**. 17, 109-116.
- Lorezen P. C., Reimerdes E. H. 1992. Enzymatic dephosphorylation of caseins and creaming behaviour of o/w emulsions stabilized with dephosphorylated casein fractions. **Die Nahrung**, 36 (6), 595 – 599.
- Lorient, D. e Linden, G. 1976. Dephosphorylation of bovine casein by milk phosphatase. **Journal of Dairy Research**, 43, 19 – 26.
- Lucey, J. A., Hauth, B., Gory, C., Fox, P. F. 1993. The acid-base buffering properties of milk. **Milchwissenschaft**, 48, 268 – 271.
- Lucey, J. A. Horne, D. S., 2009. Milk Salts: Technological Significance. Em: **Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Contituents**, 3^o ed. pp 351 – 390. Editado por Fox P. F., McSweeney P. L. H. Springer, New York, NY, USA.

M

- Marchin, S., Putaux, J-L., Pignon, F., Leonil, J. 2007. Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo-ransmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering/ultrasmall-nngle X-ray scattering. **Journal of Chemical Physics**. 126, 045101.
- Martin P., Ferranti P., Leroux C., Addeo F. 2003. Non-bovine caseins: quantitative variability and molecular diversity. Em: **Advanced dairy chemistry: Proteins vol 1**, 3^o ed. Editado por Fox P. F., McSweeney P. L. H. New York' Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.
- McGann T. C. A., Pyne, G. T. 1960. The colloidal phosphate of milk. II. Nature of its association with casein. **Journal of Dairy Research**, 27, 403 - 417.
- McGann, T. C. A., Fox, P. F., 1974. Physico-chemical properties of casein micelles reformed from urea treated milk. **Journal of Dairy Research**, 41, 45 – 53.
- McMahon, D. J., R. J. Brown. 1984. Composition, structure, and integrity of casein micelles: A review. **Journal of Dairy Science**, 67, 499–512.

McMahon, D. J., McManus, W. R. 1998. Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. **Journal of Dairy Science**, 81, 2985 – 93.

McMahon, D. J., Oommen B. S. 2007. Supramolecular Structure of the Casein Micelle. **Journal of Dairy Science**. 91, 1709–1721.

Mercier, J. C., Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. 1973. Primary structure of bovine κ -casein. Complete sequence. **European Journal of Biochemistry**, 35, 222 – 35.

Mercier, J. C. 1981. Phosphorylation of caseins, present evidence for an amino acid triplet code post-translationally recognized by specific kinases. **Biochimie**, 63, 1 – 17.

Mellander, O. 1939, Electrophoretic studies of casein. **Biochem. Z.**, 300 - 240.

Miwa, N., Yokoyama, K.; Wakabayashi, H.; Nio, N. 2010. Effect of deamidation by protein-glutaminase on physicochemical and functional properties of skim milk. **International Dairy Journal**, 20, 393 – 399.

Molina A. C. T., Alli I., Konishi Y., Kermasha S., 2007. Effect of dephosphorylation on bovine casein. **Food Chemistry**, 101, 1263 - 1271.

Mollé, D. E Léonil, J., 1995. Heterogeneity of the bovine κ -casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. 708, 223 - 230.

O

Ohmiya, K., Sugano S., Yun, S., Shimizu, S. 1983. Immobilization of acid phosphatase and its use for dephosphorylation of casein. **Agric. Biol. Chem.**, 43, 535 – 542.

P

Pearse, M. J., Linktaker, P. M., Hall, R. J., Mackinlay, A. G. 1986. **Journal of Dairy Research**, 53, 381 – 390.

Peterson, R. F. 1963. High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**. 46, 1136 - 1139.

Phillips, L. G., McGiff, M. F., Barbano, D. M., Law H. T. 1995. The influence of fat on the sensory properties, viscosity, and color of lowfat milk. **Journal of Dairy Science**, 78, 1256 – 1266.

Pierre, A., Brulé, G. 1981. Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. **Journal of Dairy Research**, 48, 417 – 428.

Pyne, G. T. McGann, T. C. A. 1960. The colloidal phosphate of milk. II. Influence of citrate. **Journal of Dairy Research**, 27, 9 -17.

R

Raouche, S., Dobenesque, M., Bot, A., Lagaude, A., Cuq, J. L., Marchesseau, S. 2007. Impact of holding time and chilled storage. **International Dairy Journal**, 17, 873 – 880.

Ribadeau-Dumas, B. R., Gamier, J. 1970. Structure of casein micelle. The accessibility of the subunits to various reagents. **Journal of Dairy Research**. 37, 269 – 278.

Rollema, H. S. 1992. Chemistry of milk proteins. Em: **Developments in Dairy Chemistry** – Volume 1. Proteins. pp. 111–140. Editado por Fox P. F. Applied Science, London, UK.

Rose, D. 1961. Variations in the heat stability and composition of milk from individual cows during lactation. **Journal of Dairy Science**. 44, 430.

S

Scaloni, A., Perillo, V., Franco, P., Fedele, E., Froio, R., Ferrara, L., Bergamo, P. 2002. Characterization of heat-induced lactosylation products in caseins by immunoenzymatic and mass spectrometric methodologies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1598, 30 – 39.

Schmidt, D. G. 1982. Association of caseins and casein micelle structure, em: **Developments in Dairy Chemistry**, Volume 1, Fox P. F. Applied Science Publishers, London, UK.

Schmitt, M., Saulnier F., Malhautier, L., Linden G. 1993. Effect of temperature on the salt balance of milk studied by capillary ion electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 640, 419 – 424.

Slattery, C. W., Evard, R. 1973. A model for the formation and structure of casein micelles from subunits of variable composition. **Biochimica et Biophysica Acta**, 317, 529 – 538.

Smith, A. K., Campbel, E. B., 2007. Microstructure of milk components, em: **Structure of dairy products**. pp. 59-71. Editado por Tamme A. Blackwell Publishing. Ayr, UK.

Steffan, W., Balzer, H., Lippert, F., Sambor, B. C., Bradbury, A. G. W., Henle, T. 2006. Characterization of casein lactosylation by capillary electrophoresis. **Eur. Food Res. Technol.**, 222, 467 – 471.

Swaisgood H. E. (2003). Chemistry of the caseins. In: P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), **Advanced Dairy Chemistry** (Vol. 1, 3rd edition, pp. 139–201). New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.

T

Thompson, M. P., R. T. Boswell, V. Martin, R. Jenness, and C. A. Kiddy. 1969a. Casein-pellet-solvation and heat stability of individual cow's milk. **Journal of Dairy Science**. 52, 796.

Thompson, M. P., W. G. Cordon, R. T. Boswell, and H. M. Farrell., Jr. 1969b. Solubility, solvation, and stabilization of asialic B-caseins. **Journal of Dairy Science**. 52, 1166.

V

Van Hekken D. L., Thompson, M. P., 1992. Application of PhastSystem® to the Resolution of Bovine Milk Proteins on Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, 75, 1204-1210.

Van Hekken, D. L., Strange, E. D. 1993. Functional Properties of Dephosphorylated Bovine Whole Casein. **Journal of Dairy Science**, 76, 3384-3391.

Van Hekken, D. L., Strange, E. D. 1994. Rheological properties and microstructure of dephosphorylated whole casein rennet gels. **Journal of Dairy Science**, 77, 907-916.

Van Hooydonk, A. C. M., Hagedoorn, H. G., Boerrigter, I. J. 1986. pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on

renneting. I Effect of acidification on physico-chemical properties. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 40, 281 – 296.

Visser, J., Miniham, A., Smits, P., Tjan, S. B., Heertje, I. 1986. Effects of pH and temperature on the milk salt system. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, 40, 351 – 368.

Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. J., Van Riel, J. A. 1986. Characterization of bovine κ -casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by highperformance gel-permeation chromatography. **Biochemical Journal**, 240, 87 – 97.

W

Walstra, P. 1979. The voluminosity of bovine casein micelles and some of its implication. **Journal of Dairy Research**, 46, 317 – 316.

Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, 73, 1965 – 79.

Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: Do they exist? **International Dairy Journal**, 9:189–192.

Walstra P. 2003. **Physical Chemistry of Foods**. Ed. Marcel Dekker, New York, USA.

Walstra, P., Wouters J. T. M., Geurts, T. J. 2006. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed., Taylor & Francis Group, USA.

Waugh, D. F., and P. H. Von Hippel. 1956. K-Casein and the stabilization of casein micelles. **J. Amer. Chem. Soc.** 78, 4576.

Waugh, D. F., Noble, R. W. Jr. 1965. Casein micelles. Formation and structure, II. **J. Amer. Chem. Soc.** 87, 22 - 46.

Waugh, D. F., e B. Talbot. 1971. Equilibrium casein micelle systems. **Biochemistry**, 10, 4153 - 4162.

Ward, L. S., Bastian, E. D. 1998. Isolation and identification of β -casein A¹-4P and β -casein A²-4P in commercial caseinatos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 77 – 83.

Y

Yamauchi, K., Takemoto, S., Tsugo, T. 1967. Calcium-binding property of dephosphorylated caseins. **Agr. Biol. Chem.**, 31, 54 – 63.

Z

Zittle, C. A., L. B. Jasewicz. 1962. Influence of sodium chloride on the stability of the calcium caseinate micelle. **Journal of Dairy Science**, 45, 703.