

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE INGREDIENTE LÁCTEO ENRIQUECIDO EM
LIPÍDEOS POLARES A PARTIR DE LEITELHO DE SORO**

Marcela de Rezende Costa
Mestre em Tecnologia de Alimentos

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
Orientadora

Prof. Dr. Rafael Jiménez-Flores
Co-orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas – Novembro/2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C823o Costa, Marcela de Rezende
Obtenção de ingrediente lácteo enriquecido em lipídeos polares a partir de leite de soro / Marcela de Rezende Costa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante
Co-orientador: Rafael Jiménez-Flores
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Filtração em membrana. 2. Extração com fluído supercrítico.
3. Membrana do glóbulo de gordura do leite. 4. Compostos bioativos.
5. Fosfolipídeos. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Jiménez-Flores, Rafael.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Obtention of dairy ingredient enriched in polar lipids from whey buttermilk
Palavras-chave em inglês (Keywords): Membrane filtration, Supercritical fluid extraction, Milk fat globule membrane, Bioactive compounds, Phospholipids

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante

Christiane Maciel Vasconcellos Barros de Rensis

Marta de Toledo Benassi

Salvador Massaguer Roig

Leila Maria Spadoti

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Dra. Mirna Lúcia Gigante
(Orientadora)

Dr. Salvador Massaguer Roig
(Membro titular)

Dra. Christiane M. V. Barros de Rensis
(Membro titular)

Dra. Leila Maria Spadoti
(Membro titular)

Dra. Marta de Toledo Benassi
(Membro titular)

Dra. Eliana Paula Ribeiro
(Membro suplente)

Dra. Clarissa Reschke da Cunha
(Membro suplente)

Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro suplente)

Campinas, ____ de _____ de _____.

Aos meus pais Maria Rosa e João Braga
Em reconhecimento pelas pessoas que
eles são e por tudo que sempre fizeram
pelos seus filhos.

AGRADECIMENTOS

À minha Família, em especial a meus pais Maria Rosa e João Braga, por tudo que têm feito por mim e pela paciência e compreensão do por quê da distância.

A Deus, por ter sempre me mostrado o caminho e por ter colocado muitas pessoas boas nele e que me ajudaram quando mais precisei.

Aos meus orientadores, Dra. Mirna Lúcia Gigante e Dr. Rafael Jiménez-Flores, pela amizade, disponibilidade, supervisão e sugestões para o trabalho, conhecimentos repassados e, principalmente, pelos bons momentos compartilhados nessa jornada.

Aos meus amigos, especialmente Marina Copetti, Aline Bombonati, Bia Thie, Walter Bergamin Filho, Mariana Fonseca, Lucinéia Cestari, Élen Nalério, Maria Helena Levy, Caroline Dias e Ursula Bertolino, pessoas queridas e companheiros de estudo, pela amizade, carinho e apoio tanto nas horas de alegria e diversão quanto nos momentos difíceis que compartilhamos.

Aos amigos inesquecíveis que fiz nos Estados Unidos, Guillaume Brisson e Marie Pierre Fortier, Melissa Ramos, Andrea Laubscher e Ben Hawkinson, Dee Bachiero, Vandna Sikand, Lola Berber-Jiménez, Jessica Yee e Jessica Morton, pela amizade e por todos os momentos que passamos juntos.

À família Bergamin, Seu Walter, D. Everli e Elizângela, pelo apoio sempre e por me receberem tão bem em sua casa.

Às amigas de república, que foram muitas durante esses anos, pela presença e amizade em todos os momentos.

Aos demais colegas da Universidade, principalmente algumas pessoas da área de leite da FEA/UNICAMP, Priscila, Gustavo, Atílio e Bete, e do DPTC/Cal Poly, Xiomara, Amy, Elizabeth, Brittany, Selena, Hannah, Scott, Peter, Ryan, Sal, Jean, Matt, Sean e Jerry, pela boa vontade e ajuda sempre que precisei na planta-piloto e laboratórios.

Aos membros da banca examinadora Dra. Marta T. Benassi, Dra. Christiane M.V.B. de Rensis, Dra. Leila M. Spadoti, Dr. Salvador M. Roig, Dra. Walkiria H. Viotto, Dra. Eliana P. Ribeiro e Dra. Clarissa R. da Cunha, pelas correções e sugestões que enriqueceram esse trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e ao Dairy Products Technology Center da Cal Poly, onde realizei meu doutorado.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado, e a CAPES, pela bolsa de estágio no exterior.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa tese e que, portanto, fazem parte desta conquista, o meu agradecimento, respeito e gratidão.

“Tudo é possível se o caminho é incerto”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Composição, estrutura e biosíntese do leite	18
3.2 Membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL).....	22
3.3 Compostos de interesse presentes na MGGL	26
3.4 Principais fontes industriais da MGGL	28
3.5 Obtenção de MGGL de fontes industriais por filtração em membrana	31
3.6 Extração com fluido supercrítico (EFS).....	36
3.7 Propriedades funcionais tecnológicas.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Esquema de processamento	42
4.2 Obtenção do leite de soro	42
4.3 Filtração em membrana	44
4.4 Secagem em spray	45
4.5 Extração com fluido supercrítico	45
4.6 Procedimento de amostragem e análises realizadas.....	47

4.7	Determinações analíticas.....	49
4.7.1	Composição centesimal.....	49
4.7.2	Perfil lipídico (CCD)	49
4.7.3	Perfil protéico (SDS-PAGE)	50
4.7.4	Teor de fosfolípídeos (CLAE).....	51
4.8	Avaliação dos produtos em pó.....	52
4.8.1	Preparo das amostras.....	52
4.8.2	Análise de tamanho de partículas.....	53
4.8.3	Solubilidade protéica.....	53
4.8.4	Estabilidade de emulsão.....	54
4.9	Delineamento experimental e análise estatística.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	Processamento.....	56
5.1.1	Caracterização das matérias-primas	56
5.1.2	Filtração em membrana.....	58
5.1.3	Extração com fluido supercrítico	61
5.1.4	Caracterização inicial dos leitelhos em pó.....	64
5.1.5	Teores de fosfolípídeos específicos.....	69
5.2	Avaliação das Propriedades Funcionais	72
5.2.1	Solubilidade protéica.....	72
5.2.2	Testes de emulsificação	76
6	CONCLUSÕES.....	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alguns componentes lácteos e suas implicações na saúde.....	21
Tabela 2.	Alguns componentes da MGGL e suas implicações na saúde.....	27
Tabela 3.	Teor médio de lipídeos polares de alguns produtos lácteos.....	30
Tabela 4.	Distribuição das análises laboratoriais de acordo com a amostra.....	48
Tabela 5.	Composição centesimal das matérias-primas e produtos obtidos.....	56
Tabela 6.	Fluxo transmembrana (FTM) durante o processo de filtração.....	59
Tabela 7.	Composição centesimal, em base seca, dos retentados de filtração em membrana.....	61
Tabela 8.	Condições de operação do equipamento de extração supercrítica.....	62
Tabela 9.	Desempenho da extração supercrítica.....	63
Tabela 10.	Fator de concentração (FC) dos componentes do leite de soro nas diferentes fases de processamento.....	68
Tabela 11.	Coeficientes das equações para quantificação dos fosfolipídeos dos produtos analisados por HPLC.....	69
Tabela 12.	Teores de fosfolipídeos dos produtos analisados por HPLC.....	70
Tabela 13.	Índice de cremeamento, após 6 horas de repouso a temperatura ambiente, de emulsões (20% óleo, 1% proteína) em pH 5 e 7.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura de um glóbulo de gordura mostrando a disposição de seus principais componentes.....	23
Figura 2.	Estrutura molecular da esfingomielina e da fosfatidilcolina, mostrando os principais grupos que formam as moléculas.....	25
Figura 3.	Esquema simplificado de obtenção de alguns produtos lácteos.	29
Figura 4.	Esquema dos principais processos de filtração por membrana.....	33
Figura 5.	Diagrama de fases do dióxido de carbono.	37
Figura 6.	Esquema geral de processamento.	43
Figura 7.	Equipamento de extração com fluido supercrítico.	46
Figura 8.	Composição centesimal relativa dos retentados de filtração em membrana.	60
Figura 9.	Perfis de lipídeos polares obtidos através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	64
Figura 10.	Composição centesimal dos leitelhos de soro em pó antes (LSP) e depois da extração supercrítica (LSP-EFS).....	65
Figura 11.	Perfis protéicos obtidos por SDS-PAGE.....	66
Figura 12.	Distribuição do tamanho de partículas determinada em soluções com 5% de proteína preparadas em pH 5 e 7.....	73
Figura 13.	Solubilidade protéica (SP%) dos leitelhos de soro em pó determinada em soluções com 5% de proteína preparadas em pH 5 e 7.....	75
Figura 14.	Distribuição do tamanho de partículas determinada em emulsões (20% óleo, 1% proteína) preparadas em pH 5 e 7.....	76
Figura 15.	Emulsões após 6 horas em repouso a temperatura ambiente.	78
Figura 16.	Cinética de cremeamento de emulsões (20% óleo, 1% proteína, pH 7) em repouso por 6 horas a temperatura ambiente.....	80
Figura 17.	Cinética de cremeamento de emulsões (20% óleo, 1% proteína, pH 5) em repouso por 6 horas a temperatura ambiente.....	81

RESUMO

O leiteiro de soro é um subproduto do processamento de manteiga a partir do creme de soro. Esse subproduto lácteo contém fragmentos da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL), material rico em componentes com funções nutricionais e efeitos benéficos à saúde, destacando-se os fosfolipídeos. O objetivo desse trabalho foi obter um ingrediente lácteo enriquecido em fosfolipídeos da MGGL a partir do leiteiro de soro utilizando a associação de duas tecnologias de fracionamento: ultrafiltração e extração com fluido supercrítico (EFS). O leiteiro de soro foi submetido à ultrafiltração e a cinco diafiltrações a 25 °C e o retentado obtido foi seco em *spray-dryer*, obtendo-se o leiteiro de soro em pó (LSP), o qual foi submetido a três ciclos de extração a 50 °C com dióxido de carbono supercrítico. As matérias-primas, produtos finais e uma amostra comercial de leiteiro tradicional em pó (LTP) foram analisados quanto a sua composição centesimal, teor de fosfolipídeos, perfis lipídico e protéico. Os leiteiros de soro em pó, submetidos ou não à EFS, e o LTP foram avaliados quanto ao tamanho de partículas e suas propriedades funcionais (solubilidade protéica e capacidade emulsificante) em pH 5 e 7. A filtração em membrana reduziu em 74 e 96% os teores de lactose e cinzas no retentado e aumentou os de proteínas, lipídeos e fosfolipídeos em 91, 190 e 300%, respectivamente. A EFS reduziu em 55,4% o teor de lipídeos, removendo exclusivamente lipídeos apolares, com isso aumentou em 71% o teor de fosfolipídeos no leiteiro de soro em pó, resultando em um produto com 73% de proteínas, 21% de lipídeos, 3% de lactose, 3% de cinzas e 12% de fosfolipídeos, em base seca. As propriedades funcionais dos leiteiros de soro em pó, submetidos à extração supercrítica (LSP-EFS) ou não (LSP), foram pouco ou não afetadas pelo pH, enquanto o abaixamento de pH prejudicou as características do LTP, devido ao alto teor de caseínas nesse tipo de pó em relação aos de leiteiros de soro. Os pós em soluções (5% de proteína) apresentaram de 69 a 84% de suas partículas, em % volumétrica, entre 10 e 100 µm. A solução de LTP em pH 5 foi a que apresentou a maior quantidade de partículas acima de 100 µm. LSP e LSP-EFS apresentaram solubilidades protéicas em torno de 86 e 84%, respectivamente, independente do pH.

O LTP teve a solubilidade reduzida de 86 para 73% quando o pH foi reduzido de 7 para 5. Em pH 7, as emulsões (20% óleo de canola, 1% proteína) de LSP e de LSP-EFS apresentaram melhor estabilidade (IC de 0,2 e 0,4%, respectivamente) do a emulsão de LTP (IC de 3,0%). Em pH 5, a emulsão de LSP-EFS foi a que mostrou melhor estabilidade, apresentando um IC de 7%, valor cerca de 82% menor do que os das emulsões de LSP e LTP. Os leitelhos de soro em pó obtidos podem ser considerados ingredientes com características promissoras, associando propriedades tecnológicas, especialmente para uso em alimentos de baixo pH, e conteúdo de compostos potencialmente benéficos à saúde, principalmente após o tratamento com extração supercrítica.

Palavras-chave: filtração em membrana, extração com fluido supercrítico, membrana do glóbulo de gordura do leite, compostos bioativos, fosfolipídeos, subprodutos lácteos.

SUMMARY

OBTENTION OF DAIRY INGREDIENT ENRICHED IN POLAR LIPIDS FROM WHEY BUTTERMILK. Whey buttermilk is a by-product from the whey cream processing into butter. This dairy by-product contains milk fat globule membrane (MFGM) fragments, a material rich in components with nutritional functions and beneficial health effects, especially phospholipids. The objective of this research was obtaining a dairy ingredient enriched in MFGM phospholipids from whey buttermilk using the association of two fractionation technologies: ultrafiltration and supercritical fluid extraction (SFE). Whey buttermilk was submitted to ultrafiltration and five diafiltrations at 25 °C. The retentate was spray-dried and later submitted to three cycles of extraction at 50 °C with supercritical carbon dioxide. Raw materials, final products and a commercial traditional buttermilk powder sample (BMP) were analyzed for gross composition, lipid and protein profiles, and phospholipids content. Whey buttermilk powders, before and after the SFE, and the BMP had particle size and some functional properties (protein solubility and emulsifying capacity) evaluated in pH 5 and 7. Membrane filtration reduced in 74 and 96% lactose and ash contents in the retentate and increased proteins, lipids and phospholipids in 91, 190 and 300%, respectively. SFE reduced in 55.4% the lipids content, removing exclusively non-polar lipids, while increased in 71% the phospholipids content in whey buttermilk powder, resulting in a product with 73% of proteins, 21% of lipids, 3% of lactose, 3% of ash and 12% of phospholipids, in dry matter basis. Functional properties of the whey buttermilk powders, treated (WBP-SFE) or not through SFE (WBP), were little or not affected by pH, while dropping the pH impaired the BMP features, due the high casein content in this type of powder in relation to the ones from whey buttermilk. The powders in solutions (5% protein) presented from 69 to 84% of the particles, in volume%, between 10 and 100 µm. The BMP solution in pH 5 was the one with the biggest amount of particles above 100 µm. WBP and WBP-SFE showed protein solubilities around 86 and 84%, respectively, independent of pH. BMP had the solubility reduced from 86 to 73% when pH was reduced from 7 to 5. In pH 7, the emulsions (20% canola oil, 1% protein) of the WBP and the WBP showed better

stability (CI of 0.2 and 0.4%, respectively) than the BMP emulsion (CI of 3.0%). When in pH 5, WBP-SFE emulsion had the best stability, presenting CI of 7%, value about 82% smaller than the ones of WBP and BMP emulsions. Whey buttermilk powders obtained in this work can be considered ingredients with promising features, combining technological properties, especially for use in low pH foods, and content of components with potential health benefits, mainly after the supercritical extraction treatment.

Keywords: membrane filtration, supercritical fluid extraction, milk fat globule membrane, bioactive compounds, phospholipids, dairy byproducts.

1 INTRODUÇÃO

A indústria láctea ocupa posição de destaque no Brasil. Porém, além de seus produtos-alvo, essa indústria gera uma grande quantidade de resíduos, os quais em grande parte podem ser considerados subprodutos. O estudo desses subprodutos da indústria tem sido tema de diversos trabalhos científicos nas últimas décadas e com o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de tecnologias emergentes viabiliza-se cada vez mais o desenvolvimento de novos ingredientes lácteos.

Dentro do setor de laticínios, o processamento de leite para a fabricação de queijos responde por uma fatia importante do mercado no Brasil e no mundo, e o soro, subproduto dessa fabricação, é altamente poluente e tem sido há muito tempo objeto de pesquisas visando seu melhor aproveitamento. O desenvolvimento da ultrafiltração em escala industrial na década de 70 e a aplicação da diafiltração (Mistry e Maubois, 1993) possibilitaram a produção comercial de concentrado protéico de soro (*whey protein concentrate – WPC*), o qual é atualmente um ingrediente lácteo amplamente utilizado na indústria de alimentos.

O soro doce utilizado para produção de concentrado protéico de soro é normalmente desnatado por centrifugação, gerando outro subproduto, o creme de soro, que pode ser misturado ao creme de leite ou utilizado diretamente para fabricação de manteiga (De Noni e Resmini, 2005). Este creme de soro, quando batido para produção de manteiga, libera uma fase aquosa chamada leitelho de soro.

O leitelho de soro, assim como o leitelho tradicional, que é liberado durante o batimento do creme de leite doce ou fermentado para produção de manteiga, contém todos os componentes do creme solúveis em água, tais como proteínas, lactose e minerais. Além disso, também contém o material derivado da membrana do glóbulo de gordura do leite, a qual é rompida durante o batimento e migra para o leitelho (Corredig e Dagleish, 1997).

Este material é de grande complexidade e contém proteínas, lipídeos, oligossacarídeos e compostos conjugados, tais como fosfolipídeos, glicolipídeos, glicoproteínas e muitos componentes com atividade biológica. Estes materiais, particularmente os fosfolipídeos, têm um importante papel como emulsificante em sistemas alimentícios e afetam numerosas funções celulares, como o crescimento e o desenvolvimento, os sistemas de transporte molecular, os processos de absorção, a memória, as respostas ao estresse, o desenvolvimento da doença de Alzheimer e a mielinização do sistema nervoso central (Astaire et al., 2003).

Embora a obtenção de ingredientes lácteos a partir do leite tradicional tenha sido estudada por diversos autores (Thompson e Singh, 2006; Morin et al., 2004; Roesch et al., 2004; Astaire et al., 2003; Corredig et al., 2003), a utilização do leite de soro como fonte de ingredientes lácteos é ainda pouco pesquisada. Entretanto, um estudo recente (Sodini et al., 2006) sugeriu que o leite de soro poderia gerar um novo ingrediente lácteo. Segundo os autores, quando comparado ao leite de creme doce e fermentado, o leite de soro apresentou maior capacidade de emulsificação e menor habilidade de formar espuma, possivelmente devido ao maior conteúdo de fosfolipídeos. Além disso, numa faixa de pH variando de 4 a 6, o leite de soro apresentou capacidade emulsificante e viscosidade estáveis, sugerindo que o produto obtido a partir do leite poderia ser utilizado para formulações de alimentos de baixo pH.

Visando aproveitar as características interessantes do ponto de vista industrial e comercial apresentadas pelo leite de soro, um subproduto da indústria láctea ainda pouco valorizado, o foco do presente trabalho foi utilizá-lo para produzir um produto/ingrediente lácteo enriquecido em componentes com propriedades tecnológicas específicas e potencialmente benéficos à saúde, especialmente os fosfolipídeos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- (1) Obter, a partir do leite de soro, um ingrediente lácteo enriquecido em lipídeos polares derivados da membrana do glóbulo de gordura do leite, através dos processos de filtração tangencial em membrana e extração com fluido supercrítico.
- (2) Caracterizar o ingrediente obtido quanto a sua composição centesimal, teor de fosfolipídeos, e perfis lipídico e protéico.
- (3) Avaliar as propriedades funcionais do ingrediente obtido, em comparação com um ingrediente comercial derivado de leite tradicional.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Composição, estrutura e biosíntese do leite

O leite é a secreção produzida pela glândula mamária de mamíferos com a finalidade de nutrir seus filhotes, sendo rico em nutrientes como proteínas, lipídeos, açúcares, vitaminas e minerais, os quais são necessários para seu crescimento e desenvolvimento. Por ser uma excelente fonte de energia e nutrientes, leite e produtos lácteos derivados de outros mamíferos, especialmente vacas, búfalas, cabras e ovelhas, têm sido utilizados há milênios na nutrição humana.

A composição do leite varia grandemente entre as espécies e, em menor intensidade, dentro da mesma espécie animal. Entre espécies, as concentrações de gordura, proteína e lactose podem variar de 1 a 50%, 1 a 20% e 0 a 10%, respectivamente (Smit, 2003). O leite bovino apresenta cerca de 87,1% de água (85,3-88,7%), 4,0% de gordura (2,5-5,5%), 3,25% de proteína (2,3-4,4%), 4,6% de lactose (3,8-5,3%) e 0,7% de minerais (0,57-0,83%). Essa proporção entre os componentes do leite é afetada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo, dentre outros, fatores genéticos, saúde do animal, alimentação, manejo e época de lactação (Walstra et al., 2006).

As proteínas do leite podem ser divididas em caseínas e proteínas do soro. As caseínas representam cerca de 80% do total protéico e precipitam quando se acidifica o leite até o pH 4,6. As proteínas do soro, as quais somam ao redor de 20% do total de proteínas, permanecem solúveis nesse pH. Distinguem-se quatro tipos de caseínas conhecidas como frações α_{S1} -, α_{S2} -, β -, e κ -caseínas, que são associadas entre si formando micelas e correspondem a cerca de 41,2%, 10,8%, 36,1% e 11,9% do total de caseínas, respectivamente. As proteínas do soro compreendem principalmente β -lactoglobulina (50,8%), α -lactalbumina (19,1%), soro-

albumina (6,3%), imunoglobulinas (12,7%) e lactoferrina (1,6%). Além disso, o leite apresenta uma grande quantidade de enzimas, distribuídas tanto na fase soro quanto associadas às caseínas. A gordura está presente na forma de glóbulos, constituídos por um núcleo, composto principalmente de triglicerídeos, protegido por uma membrana lipoprotéica, sendo que a maioria dos ácidos graxos encontrados, saturados e insaturados, contém de 2 a 20 átomos de carbono em suas cadeias. Outros lipídeos presentes incluem fosfolipídeos, colesterol, ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos. A lactose, o principal carboidrato do leite, é um dissacarídeo composto por glucose e galactose e participa, juntamente com os íons solúveis (Na^+ , K^+ e Cl^-), da manutenção do equilíbrio entre a pressão osmótica do leite e da glândula mamária. As substâncias minerais do leite são principalmente constituídas por potássio, sódio, cálcio, magnésio, cloro e fosfato, podendo estar solúveis na fase soro, na forma iônica ou complexada, ou associados à micela de caseína, principalmente na forma de fosfato de cálcio (Walstra et al., 2006; Fox e McSweeney, 1998).

Embora o leite aparente ser um líquido homogêneo, estruturalmente, é uma mistura bastante complexa de componentes. Nesse sistema, pode ser considerado que os lipídeos encontram-se em estado de emulsão, as micelas de caseína como dispersão fina, as proteínas do soro como solução coloidal, partículas lipoprotéicas como dispersão coloidal, e a lactose e parte dos sais em solução verdadeira (Walstra et al., 2006).

A produção e secreção do leite é um mecanismo fisiológico intrigante e complexo que vem sendo estudado intensamente, especialmente a partir da metade do século passado. No final da década de 90, Mather e Keenan (1998) publicaram um trabalho relatando os principais avanços atingidos até a época no entendimento da biologia celular da secreção do leite. Esses autores mostraram que nas décadas de 60 e 70 muitas descobertas importantes, relacionadas a seguir, foram feitas com relação a este assunto.

No animal lactante, o leite é produzido de maneira contínua pela glândula mamária a partir de precursores simples obtidos da corrente sanguínea do animal, como lipídeos, glucose, aminoácidos, ácido graxos, glicerol e minerais. Muitos deles são extraídos sem qualquer modificação a partir do sangue (Linzell, 1974 e 1972). A maior parte dos componentes lácteos, como caseínas, β -lactoglobulina, α -lactalbumina e lactose, é sintetizada na glândula mamária no retículo endoplásmico rugoso (RER), acumulam-se em vesículas e depois são liberados para o lúmen alveolar por exocitose (Saacke e Heald, 1974). Outros componentes podem passar diretamente do sangue para o lúmen através das junções intercelulares (transporte paracelular), como água e certos íons (Linzell e Peaker, 1971), ou atravessar a célula epitelial a partir da membrana basal em direção ao lúmen (transporte transcelular), como imunoglobulinas (Lascelles, 1977). Os lipídeos são processados no RER, o qual libera gotas lipídicas que são transportadas através do citoplasma até a membrana apical da célula epitelial (Stein e Stein, 1967), onde são liberadas para o lúmen envoltas em material de membranas celulares (Patton e Fowkes, 1967).

Mais recentemente, Bauman et al. (2006) publicaram uma nova revisão sobre os avanços científicos associados à biosíntese do leite. Importantes descobertas têm sido feitas em decorrência do desenvolvimento de técnicas modernas de manipulação genética e clonagem, por exemplo, o rápido progresso obtido na identificação das proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite (Mather, 2000). Além disso, surgiram evidências da função de duas dessas proteínas na secreção de lipídeos. Vorbach et al. (2002) e Ogg et al. (2004) substituíram genes de ratos responsáveis pela codificação da xantina desidrogenase/oxidase (XDH/XO) e da butirofilina (BTN), respectivamente. A secreção de lipídeos pela glândula mamária foi desregulada, enorme quantidade de triglicerídeos se acumulou no citoplasma das células secretoras e grandes gotas saíram da célula sem apresentarem uma membrana externa, formando agregados de gordura na glândula mamária. Esses resultados sugerem a importância dessas proteínas na secreção lipídica e foi proposto que a BTN, integrante da membrana celular apical, se liga à XDH/XO para envolver as gotas lipídicas intracelulares com a membrana plasmática.

Apesar desses avanços em relação aos compostos lipídicos, não tem sido obtido muito progresso no entendimento da regulação e secreção dos outros componentes do leite, e o grande desafio para os cientistas da área permanece sendo o entendimento de como a secreção do leite é coordenada em nível celular (Bauman et al., 2006).

Um crescente número de estudos tem voltado seu foco para a influência dos alimentos, incluindo o leite e derivados, na saúde humana. Com isso, o reconhecimento de numerosos compostos presentes em alimentos e que apresentam potencial para ajudar na manutenção da saúde e prevenção de doenças tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Muitos trabalhos têm demonstrado que o leite contém proteínas, peptídeos, ácidos graxos, lipídeos e outros compostos específicos que são componentes bioativos (Tabela 1), sendo que a membrana do glóbulo de gordura de leite (MGGL) contém significativa concentração de algumas dessas substâncias benéficas ao organismo humano.

Tabela 1. Alguns componentes lácteos e suas implicações na saúde.

Aspecto afetado	Componente lácteo envolvido		
	Derivados protéicos	Derivados lipídicos	Outros componentes
Prevenção de câncer	Soro proteínas Caseína Lactoferrina α -Lactalbumina Peptídeos Proteínas da MGGL	Ác. linoléico conjugado Ácido vacênico Esfingolipídeos Ácido butírico Ác. metiltetradecanóico	Cálcio e Selênio Lactose Vitaminas A e D Oligossacarídeos Nucleosídeos Probióticos
Aumento na saúde cardiovascular	Soro proteínas Caseína	Ác. linoléico conjugado Ácido esteárico Ácidos graxos ômega-3	Cálcio e Potássio Vitamina D
Aumento da resposta imunológica	Soro proteínas Proteínas da MGGL	Ác. linoléico conjugado	Probióticos Zinco
Aumento na saúde óssea	Peptídeos	Ác. linoléico conjugado	Cálcio, Fósforo, Vit. K

Dados compilados de Haug et al. (2007) e Bauman et al. (2006).

3.2 Membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL)

A gordura de leite é sintetizada como glóbulos de 0,1 a 15 μm na superfície do retículo endoplasmático (RE) das células secretoras das glândulas mamárias. Inicialmente, microgotas compostas principalmente por triglicerídeos são liberadas no citoplasma envoltas por uma camada de proteínas e de lipídeos polares derivados da membrana do RE (Walstra et al., 2006).

Em seu caminho para a porção apical do citoplasma, algumas microgotas se fundem e aumentam de tamanho antes de serem liberadas para o lúmen alveolar enquanto muitas outras são liberadas praticamente sem alteração de tamanho. Mais de 80% dos glóbulos de gordura do leite são menores do que 1 μm de diâmetro. Apesar disso, a média de tamanho dos glóbulos é 4 μm (Bauman et al., 2006).

A liberação dos glóbulos de gordura do leite se dá através da membrana apical da célula, sendo neste momento os glóbulos cobertos por uma membrana externa, derivada da própria membrana da célula mamária (Wiking et al., 2006). Essa membrana tem a função de impedir a coalescência dos glóbulos e a ação de enzimas lipolíticas nativas do leite sobre os lipídeos contidos no seu interior (Walstra et al., 2006).

A MGGL consiste de uma mistura complexa formada principalmente por proteínas e lipídeos. Observando-se da camada mais interna para a mais externa da MGGL (Figura 1), verifica-se primeiro uma monocamada composta por lipídeos polares e proteínas envolvendo a gota de gordura, em seguida uma cobertura proteinácea eletrodensa e, finalmente, uma bicamada de lipídeos polares e proteínas (Dewettinck et al., 2008; Evers, 2004). Sua composição e estrutura sofrem influência de diversos fatores, mas pode-se dizer que, em geral, ela é constituída por cerca de 25% de proteínas, principalmente glicoproteínas, e 70% de lipídeos, dos quais em torno de 55 a 70% são lipídeos neutros e 40% lipídeos polares (Fong et al., 2007; Walstra et al., 2006; Kanno e Kim, 1990).

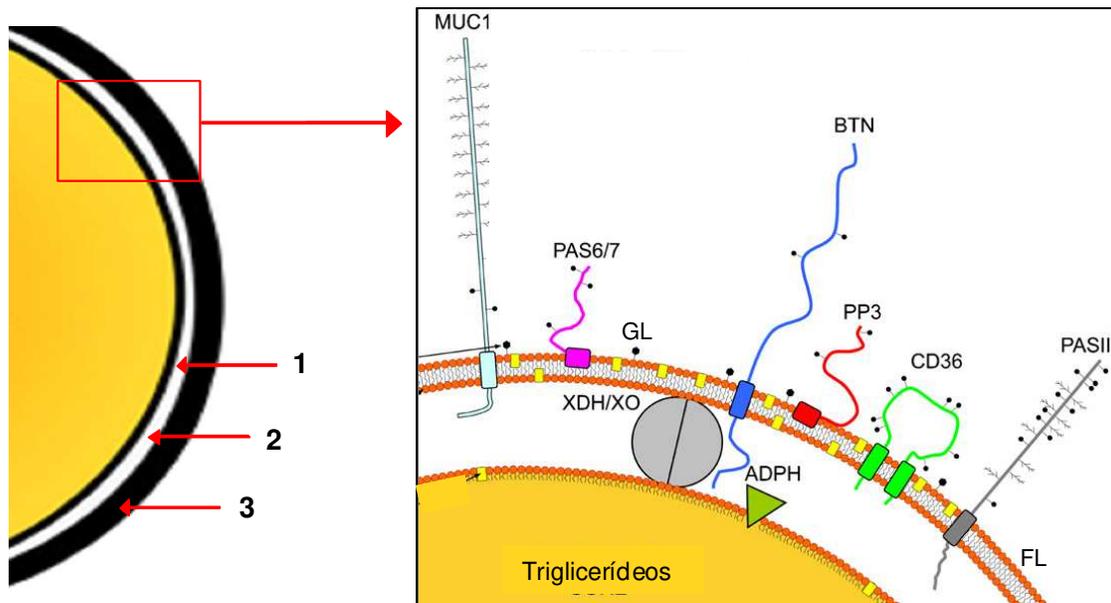


Figura 1. Estrutura de um glóbulo de gordura mostrando a disposição de seus principais componentes. 1- Monocamada interna; 2- Camada intermediária; 3- Bicamada externa; ADPH- adipofilina; BTN- butirofilina; CD36- antígenos de diferenciação; MUC1- mucina 1; PASIII- ácido periódico de Schiff III; PAS 6/7- ácido periódico de Schiff 6/7; PP3- proteose peptona 3; XDH/XO- xantino desidrogenase/oxidase; GL- glicolipídeos; FL- fosfolipídeos. Modificada de Dewettinck et al. (2008).

Os fatores que influenciam a composição e a estrutura da MGGL estão relacionados: (1) ao animal, como raça, estágio de lactação (Graves et al., 2007), alimentação (Couvreux et al., 2007) e frequência de ordenha (Wiking et al., 2006); (2) à qualidade microbiológica do leite e derivados (McPherson et al., 1984); (3) ao tratamento do leite e derivados, como, resfriamento, congelamento, danos mecânicos, tratamento com alta pressão, tratamento térmico, homogeneização e secagem (Morin et al., 2007b; Ye et al., 2007); e (4) aos métodos de isolamento e análise da MGGL (Kanno e Kim, 1990).

As proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite bovino são resolvidas em 7-8 bandas principais quando separadas através de eletroforese em gel (SDS-PAGE). Cada uma das principais bandas compreende apenas uma das principais proteínas. Porém, algumas proteínas menores apresentam a mesma mobilidade eletroforética aparente, não podendo, portanto, ser separadas através de técnicas unidimensionais, somente por eletroforese em duas dimensões (Mather, 2000).

As principais proteínas já identificadas da MGGL são: adipofilina (ADPH), butirofilina (BTN), antígenos de diferenciação (CD36), mucina 1 (MUC1), ácido periódico de Schiff III (PASIII), ácido periódico de Schiff 6/7 (PAS 6/7), proteose peptona 3 (PP3), xantino desidrogenase/oxidase (XDH/XO) e proteína ligante de ácidos graxos (FABP). BTN e XDH/XO são as mais abundantes, representando cerca de 40 e 12% do total de proteínas da MGGL, respectivamente (Spitsberg, 2005). As massas moleculares aparentes das principais proteínas da MGGL obtidas por SDS-PAGE são (em kDa): MUC1, 194; XDH/XO, 145; PASIII, 94; CD36, 78; BTN, 67; PAS 6, 50; PAS 7, 47; ADPH, 52; FABP, 13 (Riccio, 2004). Dentre elas, seis coram fortemente com Coomassie Blue (XDH/XO, CD36, BTN, ADPH, PAS 6/7 e FABP). Duas glicoproteínas, MUC1 e PAS III, não reagem com esse corante, mas podem ser detectadas com reagente de PAS (Ácido Periódico de Schiff) ou de prata (*silver stain*). Muitas proteínas menores também são detectáveis com corante de prata (Mather, 2000).

Diversas proteínas de menor concentração na MGGL continuam não identificadas. Além disso, em preparações de MGGL muitas outras proteínas podem ser observadas, a maioria consiste de proteínas periféricas fracamente adsorvidas na membrana, incluindo enzimas, imunoglobulinas e componentes derivados de leucócitos, do citoplasma das células secretoras da glândula mamária e da fração desnatada do leite (Dewettinck et al., 2008).

Dentre os lipídeos neutros, na MGGL são encontrados principalmente os triglicerídeos (~95%) e, em menor proporção, os di- e monoglicerídeos, e o colesterol e seus ésteres. Segundo Fong et al. (2007), os triglicerídeos da MGGL eram constituídos em maior proporção por ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) e menor por ácidos graxos insaturados, como miristoléico (C14:1), palmitoléico (C16:1), oléico (C18:1) e linoléico (C18:2), quando comparados aos triglicerídeos presentes na manteiga, principalmente ácidos graxos mirístico (C14:0) (13,57%), palmítico (43,77%), esteárico (16,01%) e oléico (11,92%).

Os lipídeos polares da MGGL do leite são constituídos basicamente por diversos grupos de fosfolipídeos, especialmente glicerofosfolipídeos e esfingofosfolipídeos. Os fosfolipídeos são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica. Ácidos graxos constituem a porção hidrofóbica ou apolar da molécula. Já a parte hidrofílica contém um resíduo fosfato ligado a diferentes grupos orgânicos (Figura 2), como colina, serina e etanolamina, entre outros (Dewettinck et al., 2008).

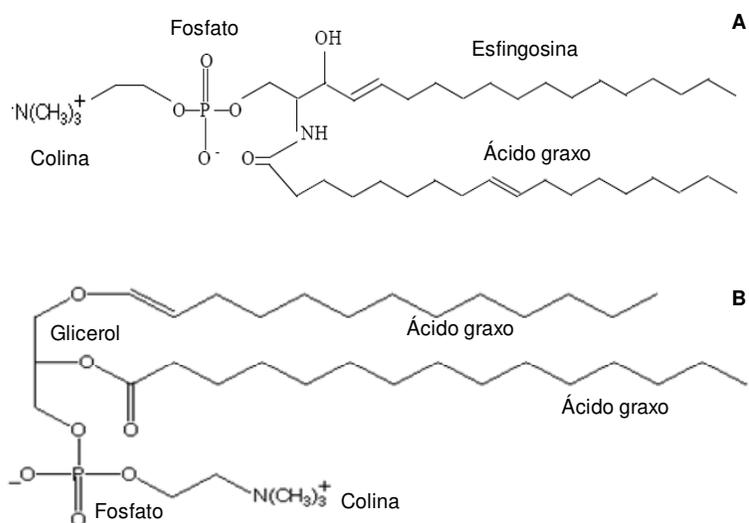


Figura 2. Estrutura molecular da esfingomielina (A) e da fosfatidilcolina (B), mostrando os principais grupos que formam as moléculas.

Fosfatidilcolina (FC, 25-40%), fosfatidiletanolamina (FE, 27-37%), esfingomielina (EM, 20-25%), fosfatidilinositol (FI, ~5%) e fosfatidilserina (FS, ~3%) são os principais fosfolípidos encontrados na MGGL (Dewettinck et al., 2008; Kanno, 1990), enquanto lisofosfatidilcolina e etanolamina são encontrados em pequenas quantidades e difosfatidilglicerol aparece apenas em traços (Fong et al., 2007). Glicolípidos também fazem parte da gordura do leite bovino, constituindo de 0,01 a 0,70% do total de lípidos. Essa fração inclui principalmente cerebrosídeos, como glucosilceramida e lactosilceramida (Fong et al., 2007). Os glicolípidos são encontrados principalmente associados à membrana do glóbulo de gordura do leite e possuem a função de mediar eventos celulares e metabólicos importantes no organismo animal (Jensen, 2002).

3.3 Compostos de interesse presentes na MGGL

Grande parte dos componentes da MGGL, especialmente os lípidos polares e as proteínas, destaca-se por sua funcionalidade tecnológica e seus possíveis efeitos benéficos à saúde. A Tabela 2 enumera os benefícios à saúde associados a alguns componentes da MGGL.

Diversos trabalhos têm mostrado a importância nutricional dos fosfolípidos e glicoproteínas presentes na MGGL. Dentre os possíveis efeitos desses componentes para a saúde humana destacam-se: redução do nível de colesterol sanguíneo, inibição do desenvolvimento de células cancerígenas, impedimento da adesão e/ou ação bacteriana no trato gastrointestinal, como de *Helicobacter pylori* e *Escherichia coli*, ação bactericida, supressão da esclerose múltipla, agentes contra doença de Alzheimer, depressão e estresse (Fong et al., 2007; Spitsberg, 2005; Noh e Koo, 2004; Riccio, 2004; Kilara e Panyam, 2003; Wang et al., 2001; Spitsberg e Gorewit, 1997). Além disso, há evidência científica de que os benefícios de alguns dos componentes da MGGL, como os esfingolípidos, são cumulativos (Dewettinck et al., 2008).

Tabela 2. Alguns componentes da MGGL e suas implicações na saúde.

Componente	Benefício à Saúde
BRCA (<i>breast cancer protein</i>) 1 e 2	Inibição de câncer de mama
FABP (<i>fatty acid binding protein</i>)	Inibição do crescimento celular Fator anticâncer (carreador de selênio)
Inibidor de β -glucuronidase	Inibição de câncer de cólon
Inibidor de <i>Helicobacter pylori</i>	Prevenção de doenças gástricas
Fator de redução da colesterolemia	Anticolesterolêmico
Butirofilina	Supressão da esclerose múltipla
Vitamina E e carotenóides	Antioxidantes
Xantino dehidrogenase/oxidase	Agente bactericida
Fosfolipídeos	Inibição de câncer de cólon Anticolesterolêmico Supressão de patógenos gastrointestinais Anti-Alzheimer, Antidepressivo, Anti-estresse

Modificado de Spitsberg (2005).

A esfingomielina e outros fosfolipídeos de interesse são também encontrados na membrana celular, no cérebro, no tecido neural, na retina e em alguns gêneros de microrganismos (Batrakov et al., 2000; Huwiler et al., 2000). Entretanto, todas estas fontes não são viáveis para a concentração e o isolamento desses lipídeos com finalidade comercial, o que torna o leite e seus derivados interessantes comercialmente para o isolamento desses compostos.

Além de suas funções biológicas e nutricionais, a MGGL apresenta propriedades tecnológicas relacionadas ao seu elevado índice dos fosfolipídeos e de outros materiais de superfície-ativa, como glicoproteínas e glicolipídeos (Roesch et al., 2004; Corredig e Dagleish, 1998). Diversas aplicações de isolados de MGGL, baseadas principalmente em suas propriedades emulsificantes, já foram relatadas. Os lipídeos polares contribuem com a maior parte dessa capacidade de emulsificação, pois são moléculas com uma parte da molécula hidrofóbica e um grupo principal hidrofílico (Dewettinck et al., 2008).

Isolados de MGGL podem ser usados em panificação para melhorar a dispersão da gordura, como aditivos ao chocolate para reduzir a viscosidade e impedir a cristalização, em produtos instantâneos para melhorar a capacidade de hidratação, e como estabilizante em margarinas (Vanhoutte et al., 2004; Szuhaj, 1983; Vannieuwenhuyzen, 1981, 1976; Göbel & Franzke, 1978). Derivados lácteos como o leitelho podem aumentar a resistência de leites recombinados frente ao tratamento térmico (Singh e Tokley, 1990), principalmente devido às interações fosfolipídeos-proteínas que impedem a coagulação da proteína durante a esterilização (McCrae, 1999), e melhorar a textura de queijos de baixo teor de gordura por causa da elevada capacidade de retenção de água dos fosfolipídeos (Turcot et al., 2001). Além disso, lipídeos polares da MGGL também podem ser utilizados para a produção de lipossomos, que serviriam como transportadores de medicamentos ou outras substâncias de interesse (Thompson e Singh, 2006; Kisel et al., 2001) e como a matéria-prima para a produção de ceramidas, aplicáveis na indústria cosmética (Becart et al.; 1990).

3.4 Principais fontes industriais da MGGL

O leite integral contém aproximadamente 0,04% de fosfolipídeos, dos quais aproximadamente 35% estão no soro do leite e 65% na MGGL (Thompson e Singh, 2006). Quando o leite é processado para a obtenção de alguns produtos lácteos (Figura 3), a membrana dos glóbulos de gordura pode ser rompida e dissociada dos mesmos durante esse processo, migrando para a fase aquosa (Corredig e Dagleish, 1997).

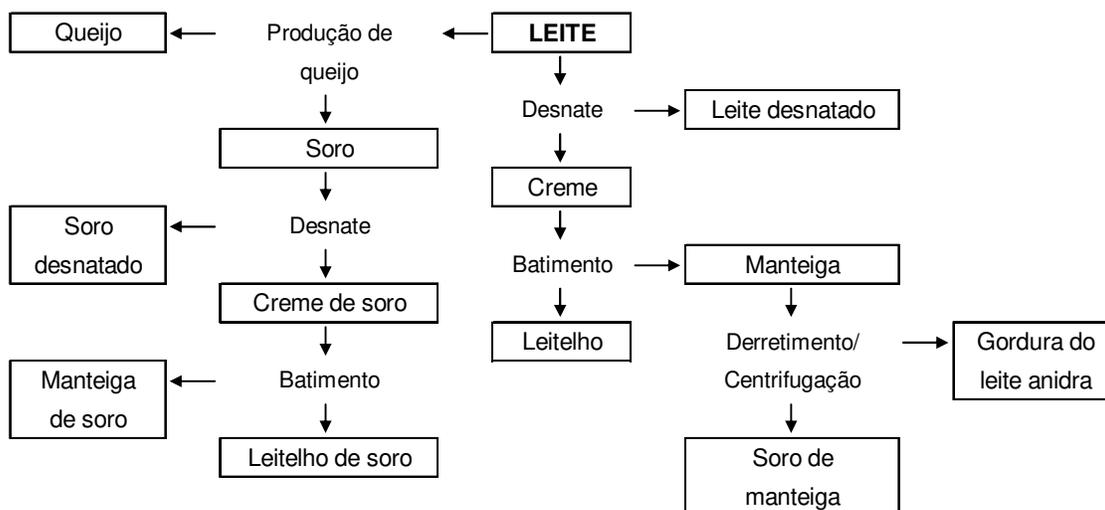


Figura 3. Esquema simplificado de obtenção de alguns produtos lácteos.

Quando o creme de leite ou de soro é batido em baixas temperaturas, a membrana do glóbulo de gordura do leite é danificada liberando os triglicerídeos presentes no interior dos glóbulos. Esses lipídeos, parcialmente cristalizados devido à baixa temperatura, começam a se unir e formar grânulos de gordura, separando-se da fase aquosa na forma de manteiga. A fase aquosa é chamada de leiteinho de soro ou leiteinho tradicional, quando resulta do batimento do creme de soro ou do creme de leite, respectivamente.

Os leiteinhos, bem como o soro de manteiga, fase aquosa separada através do derretimento e centrifugação da manteiga para a produção da gordura de leite anidra, contêm resíduos de triglicerídeos e todos os componentes hidrossolúveis do creme, tais como proteínas, lactose e minerais. Além disso, também contêm o material derivado da membrana do glóbulo de gordura do leite (Dewettinck et al., 2008; Corredig e Dagleish, 1997). O que diferencia o leiteinho de soro dos demais subprodutos citados, é que ele praticamente não apresenta resíduos de caseínas em sua composição (Sodini et al., 2006).

O creme de leite é obtido a partir do desnate do leite integral, já o creme de soro é derivado do desnate do soro, que por sua vez advém do processamento do leite para a produção de queijos (Figura 3). Nesse processo, depois da coagulação do leite, o coágulo formado é cortado e começa a liberar a parte aquosa do leite, o soro. Em seguida a massa do queijo é separada desse soro e segue para outras operações para a obtenção de cada tipo de queijo. O soro obtido pode ser classificado como soro doce, quando resulta da fabricação de queijos através do uso de enzimas como a renina, ou soro ácido, quando deriva da produção de queijos obtidos por coagulação ácida, seja pela adição de ácidos orgânicos ou de culturas lácticas iniciadoras. O soro advindo da produção de queijo é normalmente desnatado antes de ser processado para a produção de concentrado protéico de soro, gerando o creme de soro, que pode ser misturado ao creme de leite ou utilizado diretamente para fabricação de manteiga (De Noni e Resmini, 2005).

Durante o processamento do leite em produtos como o queijo e a manteiga, os lipídeos polares são preferencialmente distribuídos para a fase aquosa, como pode ser observado na Tabela 3. O mesmo acontece com as proteínas da MGGL, já que estão fortemente associadas a esses lipídeos da membrana (Dewettinck et al., 2008). Deste modo, subprodutos da indústria láctea, como os leitelhos e os soros de queijo e de manteiga, são ricas fontes de material da MGGL.

Tabela 3. Teor médio de lipídeos polares de alguns produtos lácteos.

Produto	Teor de Lipídeos Polares*	
	(%)	(% em base seca)
Leite	0,04	0,30
Creme	0,20	0,40
Manteiga	0,20	0,25
Leitelho	0,16	2,00
Soro de manteiga	1,25	11,50
Soro doce	0,02	0,30
Soro ácido	0,10	1,80
Leitelho de soro	0,10	1,30

* Dados compilados de Rombault et al. (2006, 2007) e Morin et al. (2006).

3.5 Obtenção de MGGL de fontes industriais por filtração em membrana

A identificação de funções biológicas e tecnológicas dos constituintes da MGGL conduziu ao interesse em concentrar e isolar estes constituintes a partir de subprodutos lácteos, tais como o leite. Porém, os constituintes da MGGL são encontrados em baixas concentrações nesses produtos, o que apontou para a necessidade de desenvolvimento de técnicas para concentrar estes constituintes e produzir ingredientes/produtos ricos nestes materiais.

Diversos tratamentos têm sido utilizados visando atingir esse objetivo, principalmente processos de filtração através de membranas (Morin et al., 2007a, 2004; Rombaut et al., 2007, 2006; Roesch et al., 2004; Astaire et al., 2003; Corredig et al., 2003; Sachdeva e Buchheim, 1997), onde o isolamento de material da MGGL é baseado na remoção seletiva de caseína, proteínas do soro, lactose e minerais do concentrado de filtração. Nesse tipo de processo, o maior obstáculo encontrado é a similaridade em tamanho entre as micelas de caseína e os fragmentos da MGGL. Assim, alguns trabalhos utilizam um tratamento preliminar na matéria-prima para remover ao máximo a fração caseica (Morin et al., 2007a; Rombaut et al., 2007; Roesch et al., 2004; Corredig et al., 2003; Sachdeva e Buchheim, 1997).

Processamentos através de membranas são técnicas de filtração tangencial com o objetivo de separar um líquido em duas frações com diferentes composições, o retentado e o permeado, através do uso de uma membrana com permeabilidade seletiva. De maneira geral, pode-se dizer que a separação de componentes ocorre baseada no tamanho das moléculas a serem filtradas, sendo a pressão hidrostática utilizada como principal força motriz do processo, embora alguns processos também sejam baseados em diferenças de concentração ou de potencial elétrico (Walstra et al., 2006).

Uma vasta gama de produtos pode ser tratada utilizando-se a tecnologia de membranas. A desalinização de água ocupa o primeiro lugar, representando cerca de 80% do mercado, seguida pela indústria de alimentos, principalmente a de produtos lácteos (Wagner, 2001). Os principais processos de filtração por membranas utilizados são osmose reversa, nanofiltração, ultrafiltração e microfiltração. Estes processos se diferenciam principalmente quanto ao tamanho das moléculas que podem passar através da membrana e à magnitude de pressão utilizada (Figura 4).

A microfiltração (MF) é um processo intermediário entre a filtração comum e a ultrafiltração. Os poros da membrana variam de 0,1 a 10 μm e a diferença de pressão utilizada para a separação é da ordem de 1 a 10 bar. O método pode ser aplicado para remover partículas pequenas e microrganismos da salmoura de queijos, bactérias do leite desnatado, e para remoção da gordura do leite. A ultrafiltração (UF) separa macromoléculas da solução. Partículas como micelas de caseína, glóbulo de gordura, células somáticas e bactérias são retidas. O tamanho dos poros varia de 1 a 100 nanômetros, e é um processo utilizado frequentemente em leite desnatado, soro, e leite para a produção de queijos. A nanofiltração (NF) e a osmose reversa são processos aplicados principalmente ao soro para desalinização (NF) e remoção de água (NF e OR), e que necessitam da utilização de pressões transmembrana acima de 20 bar (Walstra et al., 2006; Tetra Pak, 2003).

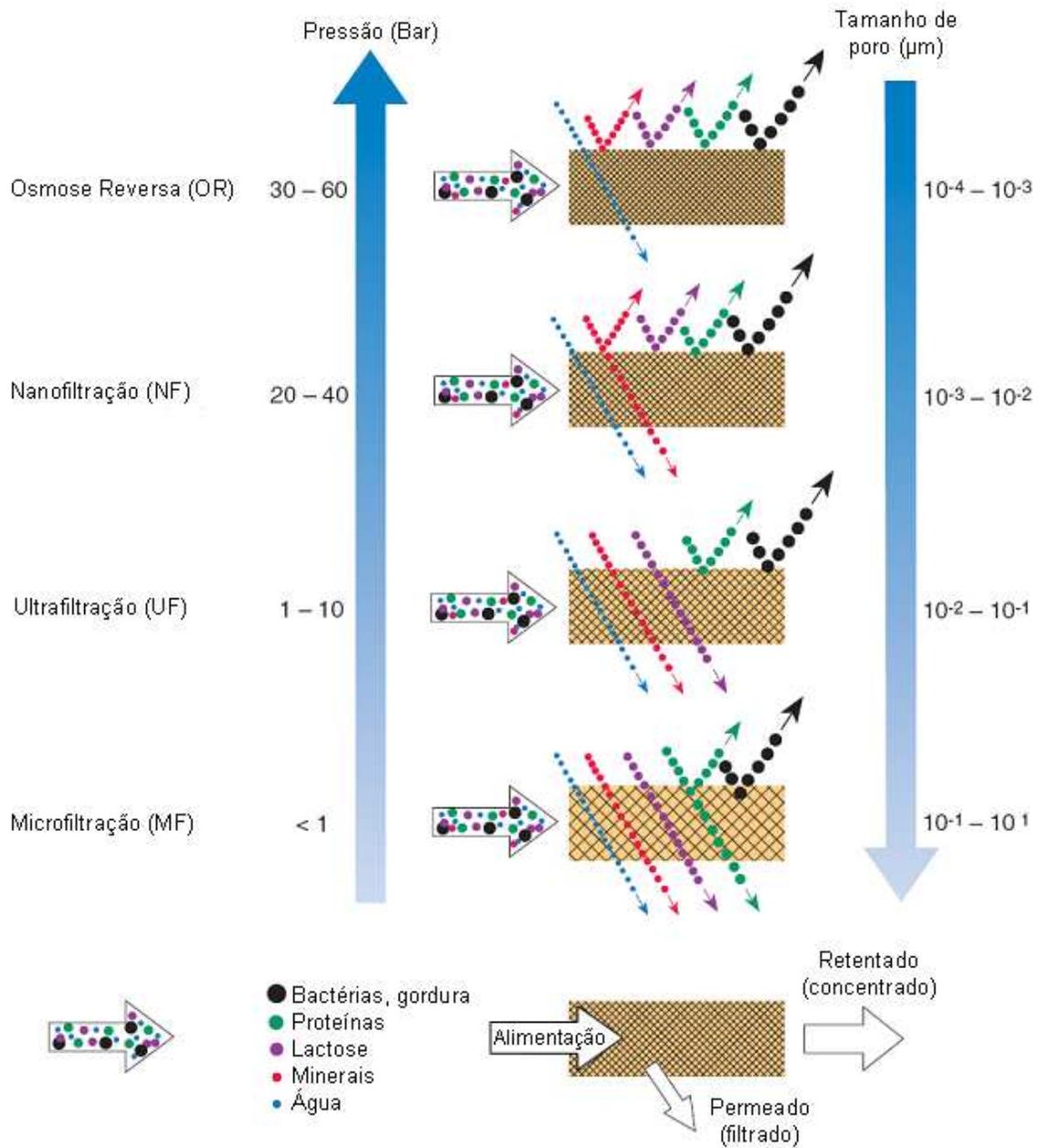


Figura 4. Esquema dos principais processos de filtração por membrana. Modificado de Tetra Pak (2003).

Microfiltração (MF) foi utilizada por Morin et al. (2004) com o objetivo de separar os constituintes da MGGL a partir de leiteiro. Os autores avaliaram o efeito da temperatura do processo (7, 25 e 50 °C) e do tamanho dos poros da membrana (0,1, 0,8 e 1,4 µm) sobre a separação de proteínas e lipídeos (neutros e fosfolipídeos) durante a microfiltração de leiteiro fresco e reconstituído. O estudo demonstrou que a temperatura de microfiltração, o tamanho do poro da membrana e o tipo de leiteiro (fresco ou reconstituído) influenciaram a separação de lipídeos e proteínas. Os melhores resultados foram obtidos com o menor tamanho de poro e a 25 °C, já que nessas condições foi atingida a maior retenção de lipídeos. Os autores concluíram que a microfiltração sozinha não possibilitou uma adequada separação de lipídeos e proteínas para a produção de um novo ingrediente lácteo a partir do leiteiro, possivelmente devido à presença de caseína.

Embora a separação dos constituintes da MGGL não tenha sido conduzida eficientemente somente pela microfiltração (Morin et al., 2004), segundo Corredig et al. (2003) este processo se mostrou mais eficiente para concentrar o material da MGGL a partir do leiteiro quando este foi adicionado de citrato de sódio antes da microfiltração. Segundo os autores, o citrato de sódio causou a dissociação das micelas de caseína e permitiu a permeação de grande proporção de proteínas derivadas do leite desnatado através da membrana de MF, concentrando o material da MGGL no retentado.

Este método de separação da MGGL por microfiltração na presença de citrato de sódio foi utilizado por Roesch et al. (2004) para preparar um concentrado utilizado como estabilizante de emulsões de óleo em água (O/A). Esse procedimento de isolamento resultou em um ingrediente com funcionalidade diferente quando comparado ao leiteiro concentrado preparado de maneira similar, porém contendo ainda a razão inicial de proteínas (caseína, proteínas do soro e da MGGL). A associação de citrato de sódio e microfiltração foi utilizada também por Rombault et al. (2006), mas tendo soro de manteiga como matéria-prima. O citrato aumentou a

passagem de caseína pela membrana, mas também resultou em uma perda significativa de material da MGGL.

Renina, ácido cítrico ou culturas lácticas podem ser usados como coagulantes para remover a caseína antes da utilização da microfiltração (Sachdeva e Buchheim, 1997). Além disso, a lavagem do creme utilizando ultrafiltrado de leite desnatado antes do seu processamento para a obtenção de manteiga e leitelho se mostrou eficiente para remover proteínas do soro e caseínas, permitindo um fluxo maior durante a microfiltração e diafiltração do leitelho, e um concentrado com maior teor de lipídeos e fosfolipídeos (Morin et al., 2007a).

Uma alternativa para evitar a presença de caseína nos concentrados de MGGL ainda pouco explorada é o uso de matérias-primas com naturalmente pouco ou nenhum resíduo desse tipo de proteína, como o soro e o leitelho de soro. Rombault et al. (2007) utilizaram microfiltração de soro ácido com prévia agregação termocálcica. Essa associação provocou um baixo fluxo de permeado e alta retenção de todos os componentes do soro, mostrando-se pouco aceitável como técnica de purificação de material da MGGL. Além disso, uma grande parte dos lipídeos polares foi perdida quando a diafiltração foi utilizada.

Utilizando duas técnicas de separação, a microfiltração e a extração com fluido supercrítico, Astaire et al. (2003) desenvolveram um método para produzir ingredientes derivados do leitelho contendo alta concentração de fosfolipídeos. O leitelho foi microfiltrado, diafiltrado e submetido à secagem em spray para a obtenção de um pó. Em seguida, a extração com CO₂ supercrítico foi aplicada para remover exclusivamente lipídeos não polares do material. A análise lipídica mostrou que após a extração supercrítica o produto apresentou significativa redução na concentração de lipídeos não polares e um aumento na concentração de lipídeos polares derivados da MGGL.

Não foram encontrados trabalhos de filtração de leite através de sistemas de ultrafiltração. Todos os trabalhos utilizaram a microfiltração como técnica de separação e Morin et al. (2004) demonstraram que uma melhor retenção de lipídeos foi obtida com menores tamanhos de poros na membrana, a 25 °C. Os autores dos diferentes trabalhos (Rombault et al., 2006 e 2007; Morin et al., 2004; Roesch et al., 2004; Astaire et al., 2003; Corredig et al., 2003; Sachdeva e Buchheim, 1997) buscavam a concentração de lipídeos associada à eliminação da maior quantidade possível de caseína, o que seria impossível através da ultrafiltração, devido ao tamanho reduzido dos poros da membrana.

Com base nestes resultados, é razoável supor que a utilização de matéria prima sem resíduos de caseínas, como o leite de soro, e a utilização da ultrafiltração, como técnica de concentração, resultariam na obtenção de um produto mais concentrado em lipídeos, quando comparado ao obtido por microfiltração. Além disso, produtos específicos, com alta concentração de material advindo da MGGL poderiam ser obtidos quando este material fosse submetido à EFS.

3.6 Extração com fluido supercrítico (EFS)

Um fluido supercrítico é qualquer substância em condições de temperatura e pressão acima do seu ponto crítico termodinâmico, ou seja, ponto em um gráfico de Temperatura x Pressão onde termina a curva de vaporização da substância (Figura 5).

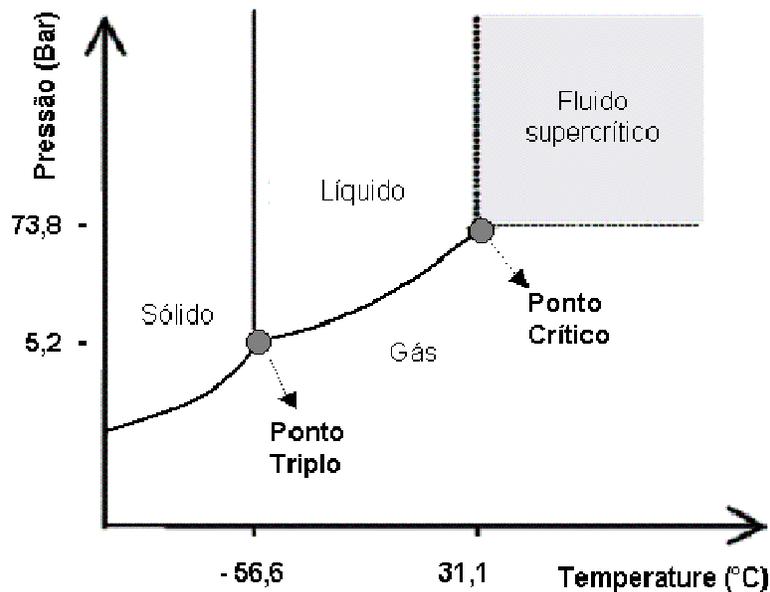


Figura 5. Diagrama de fases do dióxido de carbono.

Em um diagrama de fases pode ser visto como as mudanças de temperatura e de pressão influenciam o estado físico da substância avaliada, a qual pode existir como sólido, líquido, gás ou fluido supercrítico, dependendo das condições. No ponto triplo do gráfico, a substância pode existir como sólido, líquido e gás, simultaneamente. Aumentando a temperatura e a pressão acima dessas condições pode se atingir o ponto crítico, e a partir daí a substância se transforma em fluido supercrítico. Isso significa que a partir deste ponto é impossível distinguir claramente o estado gasoso do estado líquido. Acima desse ponto, se a temperatura é aumentada, o único estado que continua existindo é o supercrítico, e a densidade do fluido permanece constante. Porém, se a pressão é aumentada, a densidade muda e se torna equivalente à de um solvente líquido. Assim, um fluido supercrítico apresenta propriedades únicas, algumas de gás e outras de líquido, como poder se difundir através de sólidos como um gás e dissolver componentes de materiais como um líquido (Ksibi, 2004; Turner et al., 2001).

A extração com fluido supercrítico (EFS), assim como os processos de filtração por membrana, é um método que pode fracionar seletivamente componentes de uma mistura complexa. Um solvente em estado supercrítico é utilizado para carrear a substância de interesse do produto submetido à extração. Quando em contato com uma amostra, o fluido supercrítico solubiliza determinados compostos dependendo de numerosos fatores, como as polaridades do solvente e do soluto, as condições de pressão e temperatura, e a complexidade da matriz (Haunthal, 2001).

A extração com fluido supercrítico pode ser dividida nas seguintes fases: (1) difusão do fluido supercrítico na matriz da amostra, (2) liberação de compostos solúveis, (3) saída desses solutos da matriz, e (4) arraste desses compostos pelo fluido supercrítico. Ao final do processo, quando o fluido supercrítico volta a temperatura ambiente, os solutos podem ser separados do solvente e o fluido volta para seu estado normal (Turner et al., 2001).

Uma ampla variedade de solventes está disponível para uso em extração supercrítica, incluindo dióxido de carbono, óxido nítrico, propano, *n*-pentano e amônia. O princípio básico do processo de extração é o fato de que esses gases em estado fluido (supercrítico) são capazes de dissolver maiores quantidades de substâncias naturais em relação ao que gases em pressão parcial poderiam normalmente dissolver. O CO₂ é normalmente o solvente escolhido por alcançar facilmente as condições supercríticas (31,1 °C e 73,8 bar) e ter vantagens tais como baixo custo, baixa toxicidade e inflamabilidade, alta pureza e não deixar resíduos após a extração (Zougagh et al., 2004; Hauthal, 2001). Além disso, a extração supercrítica também tem se mostrado como um processo não-térmico para destruir microrganismos vegetativos e endósporos (Spilimbergo et al., 2002; Enomoto et al., 1997).

As opções de uso da extração supercrítica em alimentos, especialmente utilizando CO₂ supercrítico como solvente, são variadas. A extração de óleos essenciais e outras substâncias de frutas, sementes, castanhas e outras partes de plantas, como citros (Mendes et al., 1997), capim-limão (Sarmiento et al., 2004), pupunha (Araújo et al., 2000), macadâmia (Silva et al., 2008), castanha de caju (Lameira et al., 1997), café (Lucas e Cocero, 2006), folhas de chá mate (Saldaña et al., 2000), gengibre (Nobrega et al., 1997), soja (Araujo et al., 2000) e alecrim (Coelho et al., 1997), dentre outros, tem sido o campo de maior estudo dessa técnica. Recentemente, a extração supercrítica foi utilizada por Astaire et al. (2003) para remover lipídeos não-polares de leite em pó com o objetivo de concentrar lipídeos polares. Porém, a EFS não é utilizada apenas em nível laboratorial. Essa técnica tem sido aplicada com sucesso em plantas de escala comercial na Europa e Estados Unidos em processos de extração envolvendo café, chá e alguns condimentos (Huang et al., 2004).

Alguns outros trabalhos utilizando a extração supercrítica para remover lipídeos de leite e produtos lácteos já foram publicados. De modo geral, as principais observações desses estudos foram: (1) a solubilidade dos triglicerídeos no fluido supercrítico varia de acordo com seu comprimento de cadeia, (2) o aumento da pressão de extração leva a uma maior solubilidade total dos triglicerídeos até que um patamar seja atingido, (3) a extração de triglicerídeos de cadeia longa é favorecida com o aumento da pressão, enquanto a dos triglicerídeos de cadeia curta e média diminui, e (4) a presença de lactose dificulta o processo de extração (Astaire et al., 2003; Turner et al., 2001; Hierro et al., 1995; Arul et al., 1994).

3.7 Propriedades funcionais tecnológicas

Tecnologicamente, uma propriedade funcional de um material é sua habilidade para produzir uma característica específica desejada no produto onde ele é aplicado em concentrações e condições apropriadas. As propriedades funcionais de um componente podem ter efeito sobre diversos atributos de produtos alimentícios, como aparência, cor, suculência, sensação na boca e textura. Essa funcionalidade pode ser afetada pelo pH, força iônica, temperatura e tamanho das partículas, e apresenta-se dependendo de interações com o meio e com outros componentes presentes no produto. Por exemplo, as propriedades de rehidratação e de solubilidade das proteínas estão relacionadas com sua interação com a água, já as de capacidade emulsificante e de estabilização de emulsões estão ligadas à interação de proteínas e lipídeos (Sikorski, 2007).

Na avaliação de ingredientes em pó de base protéico-lipídica, parâmetros de propriedades emulsificantes e de solubilidade protéica são frequentemente determinados. A estabilidade de uma emulsão é definida como a capacidade da emulsão de manter sua estrutura ao longo do tempo, e sua medida pode ser direta (avaliação do tamanho das partículas por um instrumento de retro-difusão de luz) ou indireta (medida da quantidade de óleo ou fase aquosa separada por desestabilização) (Linden e Lorient, 1999). Já a solubilidade protéica é definida como o percentual em relação à quantidade total de proteínas contida em um sistema que pode ser extraído por água ou outro solvente sob condições específicas (Sikorski, 2007).

Diversos ingredientes protéicos em pó estão disponíveis comercialmente e são amplamente utilizados devido a suas propriedades tecnológicas como capacidade espumante (leite desnatado em pó e clara de ovo desidratada), capacidade emulsificante (leitelho em pó, gema de ovo desidratada e proteína

isolada de soja) e capacidade de retenção de água (leitelho em pó, concentrado e isolado protéico de soro, e proteína isolada de soja).

Wong e Kitts (2003) compararam as propriedades funcionais de diversos ingredientes em pó (leitelho, leite desnatado, proteína isolada de soja, clara e gema de ovo). O leitelho apresentou capacidade de retenção de água e de absorção de lipídeos, e capacidade espumante limitadas. Porém, demonstrou capacidade emulsificante e estabilidade da emulsão similares aos demais produtos testados. Sodini et al. (2006) avaliaram as propriedades funcionais de diferentes tipos de leitelho em pó, obtidos a partir de creme de leite doce e ácido, e de creme de soro. O leitelho de soro apresentou as melhores propriedades emulsificantes e a menor capacidade espumante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

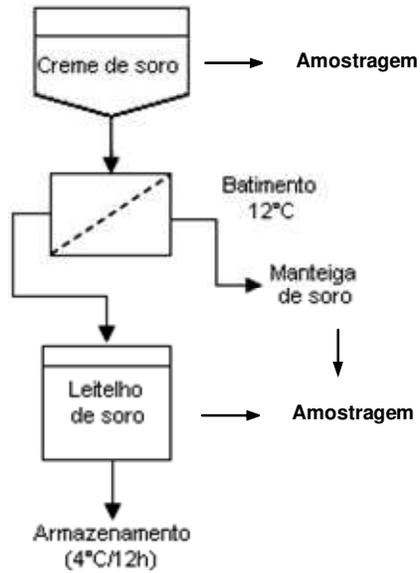
4.1 Esquema de processamento

No presente trabalho, creme de soro (CS) foi processado na planta-piloto do Dairy Products Technology Center (DPTC) da California Polytechnic State University (Cal Poly), Estados Unidos, para a obtenção de dois tipos de produtos finais: leiteiro de soro em pó (LSP) e leiteiro de soro em pó tratado por extração com fluido supercrítico (LSP-EFS). Para o desenvolvimento do trabalho foram seguidas as etapas esquematizadas na Figura 6, as quais podem ser resumidas em: (1) batimento do creme do soro, para obtenção do leiteiro de soro (LS); (2) filtração em membrana, para a obtenção do concentrado de leiteiro de soro (CLS); (3) secagem em spray, para a obtenção do leiteiro de soro em pó (LSP); e (4) extração com fluido supercrítico (EFS), para obtenção do leiteiro de soro em pó tratado com EFS (LSP-EFS). Todo o processo, desde a recepção do creme de soro até a obtenção do leiteiro em pó, foi realizado em triplicata.

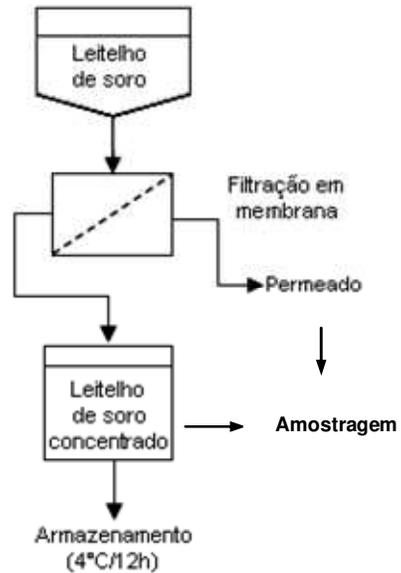
4.2 Obtenção do leiteiro de soro

Para a obtenção do leiteiro de soro, três bateladas de creme de soro doce pasteurizado foram fornecidas pela Hilmar Cheese Company (Hilmar-CA, EUA). O creme de soro foi processado a 12 °C em um batedor rotatório (Blentech Corporation, Santa Rosa-CA, EUA) para a separação em manteiga (M) e leiteiro de soro. O leiteiro foi passado por uma peneira para remoção de finos de manteiga, coletado em latões de alumínio previamente higienizadas e estocado em câmara fria a 4 °C por cerca de 12 horas, até a realização do processo de filtração em membrana. Para os ensaios 1, 2 e 3 foram utilizados 118,2, 111,6 e 128,2 kg de creme de soro e obtidos 60,0, 55,8 e 63,5 kg de leiteiro de soro, respectivamente.

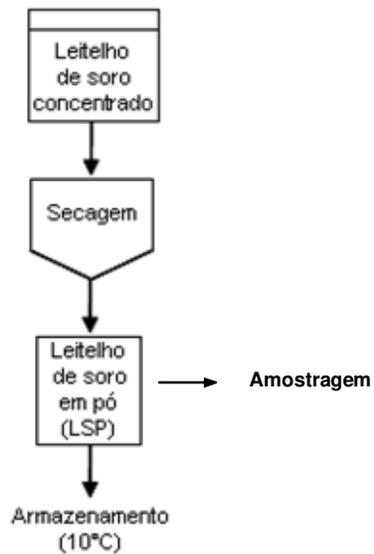
Etapa 1



Etapa 2



Etapa 3



Etapa 4

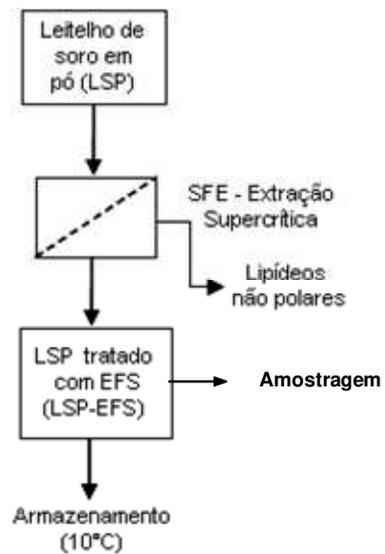


Figura 6. Esquema geral de processamento.

Após a filtração e secagem em spray, foram obtidos 1,5 kg de leiteiro de soro em pó (LSP), no total dos três processamentos. Nem todo o leiteiro de soro em pó obtido foi submetido a extração supercrítica (EFS), apenas a quantidade do pó resultante de cada ensaio necessária para a realização das análises posteriores. Entretanto, fazendo-se uma projeção, se todo o LSP obtido tivesse passado por esse procedimento, ao final dos três processamentos seria obtido cerca de 1 kg de leiteiro de soro em pó submetido à EFS (LSP-EFS) no total.

4.3 Filtração em membrana

Leiteiro de soro foi ultrafiltrado a 25 °C em um sistema em escala piloto de filtração tangencial em membrana (Modelo R-12, GEA-Niro Filtration, Hudson-WI, EUA) usando em paralelo duas membranas poliméricas espirais (Peso molecular de corte de 10 kDa e 11,33 m² de área de superfície de membrana no total). O processo foi conduzido utilizando-se ao redor de 10 bar de pressão de alimentação e 4 bar de pressão de saída, e bomba de alimentação operando a 35 Hz.

A ultrafiltração (UF) foi conduzida até que um fator de concentração volumétrica de aproximadamente 10x fosse atingido. Então, foi realizado o processo de diafiltração (DF) através da adição contínua de água a 25 °C ao retentado de UF, correspondendo a um fator de diafiltração (F_{DF}) de 5x, ou seja, cinco vezes o peso inicial do leiteiro, e remoção concomitante dessa água junto ao permeado. No início de cada fase do processo de filtração, o fluxo de permeado foi avaliado mensurando-se a quantidade de permeado liberada durante um minuto. Posteriormente, o fluxo transmembrana foi calculado levando-se em conta a área total da membrana, gerando um resultado expresso como a quantidade de permeado, em litros, por hora por metro quadrado de membrana.

O sistema de membranas foi submetido ao procedimento de limpeza completa antes e depois da realização de cada replicata. O sistema foi enxaguado com água (60 °C) por 15 minutos, seguido por limpeza alcalina (pH 10-12) a 75 °C por 45 min (Alcali: Ultrasil 25, EcoLab, Canadá), enxágue com água (60 °C) até atingir o pH normal da água (~7,5), limpeza ácida (pH 2-4) a 50 °C por 30 min (Detergente ácido: Ultrasil 76, EcoLab, Canadá), e, finalmente, o sistema foi enxaguado com água até retornar ao seu pH normal.

4.4 Secagem em spray

O retentado final da filtração foi estocado refrigerado (~ 4 °C) até o dia seguinte, quando foi transformado em pó utilizando um equipamento de secagem em spray (Niro Filterlab Spray-drier, Hudson-WI, EUA). O equipamento dotado de atomizador de bico e foi operado nas seguintes condições: temperatura de entrada do produto, ~10 °C; pressão, 30 bar; temperatura de entrada do ar, 185 °C; temperatura de saída, 95 °C. O produto final obtido foi chamado de leite de soro em pó (LSP).

4.5 Extração com fluido supercrítico

A Figura 7 mostra o sistema de extração com fluido supercrítico (EFS) (Thar Designs, Pittsburgh-PA, EUA).

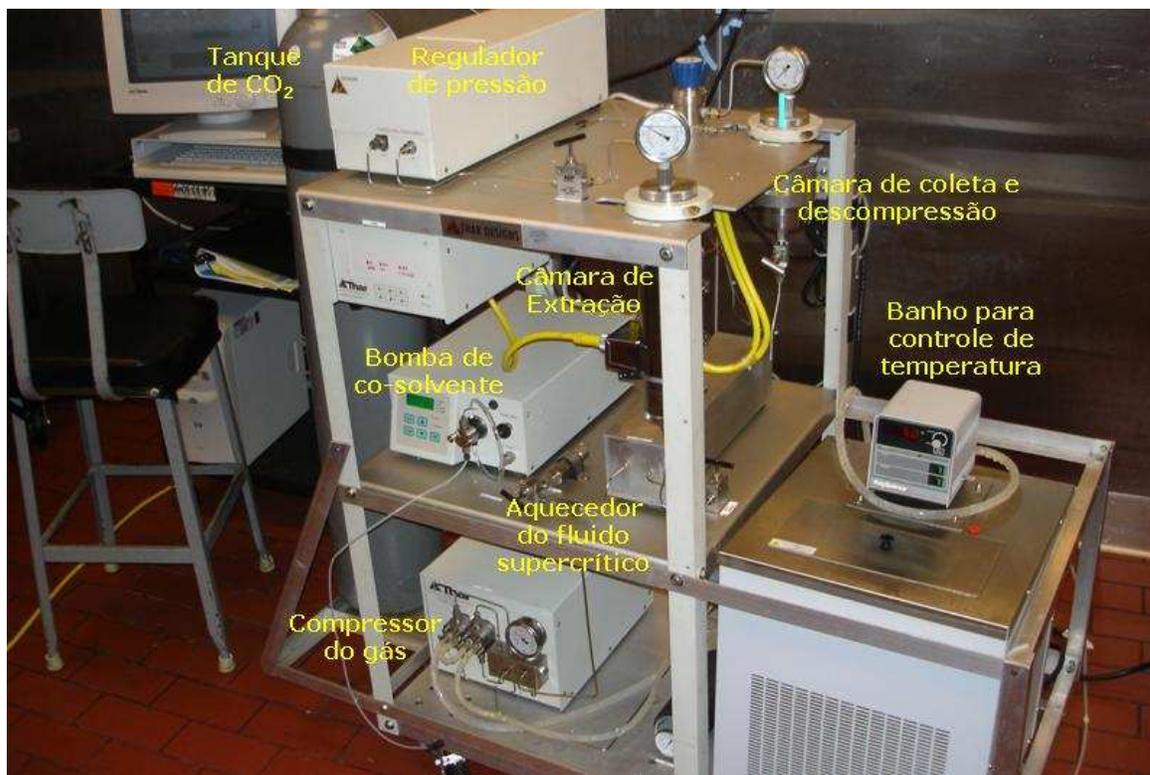


Figura 7. Equipamento de extração com fluido supercrítico.

O sistema de extração era composto de: câmara de amostra (500 mL de capacidade), bomba de alta pressão (modelo P-50), regulador automatizado de pressão (modelo BPR-A-200B) e unidade de banho de água com bomba (modelo 9505). Água deionizada a 3 °C foi circulada para resfriar diferentes zonas do equipamento de EFS. Tanques contendo o dióxido de carbono utilizado para a extração foram enchidos e inspecionados por A & R Welding Supply (San Luis Obispo-CA, EUA). As condições do sistema foram controladas por um software específico para Windows 2000 (Hewlett-Packard).

Os pós de leiteiro de soro, aproximadamente 135 g para cada replicata, foram submetidos a três ciclos de EFS usando as seguintes condições: substância extratora, 1500 g de CO₂ a uma vazão de 20 g/min; pressão de extração, 350 bar;

temperatura de extração, 50 °C; temperatura de coleta, 50 °C. O produto final obtido foi chamado de leite de soro em pó tratado com fluido supercrítico (LSP-EFS).

4.6 Procedimento de amostragem e análises realizadas

Os pontos de coleta de amostras em todas as etapas de processamento estão indicados na Figura 6. Amostras representativas foram coletadas em cada ponto de amostragem e armazenadas congeladas (-18 °C), no caso de amostras líquidas, ou refrigeradas (10 °C), no caso das amostras em pó, para posterior análise.

O creme de soro pasteurizado e refrigerado foi transportado, em latões previamente higienizados, da indústria para a planta piloto de processamento do DPTC (Dairy Products Technology Center), onde foi processado em manteiga e leite de soro. Foram coletadas amostras das três bateladas de creme de soro no momento do recebimento, assim como amostras de manteiga e de leite de soro logo após suas obtenções.

Amostras de retentado (R) foram coletadas e o fluxo de permeado foi mensurado no começo e no final do processo de UF e quando cada etapa do processo de DF foi completada (1DF, 2DF, 3DF, 4DF e 5DF). Também foram coletadas amostras dos leites de soro em pó, logo após a secagem do concentrado de leite de soro, e dos leites de soro em pó tratados com EFS.

As análises físico-químicas e de propriedades funcionais das amostras foram realizadas seguindo-se a distribuição apresentada na Tabela 4. Além das determinações analíticas realizadas nas matérias-primas e produtos obtidos dos processamentos (Figura 6), para efeito de comparação, também foi analisada uma amostra comercial de leite tradicional em pó (LTP) (Extra Grade Dry Buttermilk, Challenge Dairy Products Inc., Dublin-CA, EUA), obtido a partir do processamento de

creme de leite em manteiga e leiteiro. Essa amostra comercial tinha a seguinte composição em base seca: 31% de proteínas, 54% de lactose, 6% de gordura e 9% de cinzas.

Todos os tipos de amostra (creme de soro, manteiga de soro, leiteiro de soro, retentados, leiteiro de soro em pó, leiteiro de soro em pó tratado com EFS, leiteiro de soro em pó comercial) foram analisados quanto a sua composição centesimal (teores de proteína, lipídeos, cinzas e sólidos totais). O perfil protéico só não foi avaliado nas amostras de manteiga e dos retentados do processo de filtração em membrana. O perfil lipídico foi avaliado nas amostras em pó, enquanto o teor de fosfolipídeos só não foi determinado nas amostras de retentado. As amostras em pó foram submetidas a todas as análises realizadas neste trabalho, incluindo análises do tamanho de partículas, solubilidade protéica e estabilidade de emulsão, além das análises já mencionadas.

Tabela 4. Distribuição das análises laboratoriais de acordo com o tipo de amostra.

Análises	CS	M	LS	R	LSP	LSP-EFS	LTP
Teor de proteínas	x	x	x	x	x	x	x
Teor de lipídeos	x	x	x	x	x	x	x
Teor de cinzas	x	x	x	x	x	x	x
Teor de sólidos totais	x	x	x	x	x	x	x
Teor de fosfolipídeos	x	x	x		x	x	x
Perfil lipídico					x	x	x
Perfil protéico	x		x		x	x	x
Tamanho de partículas					x	x	x
Solubilidade protéica					x	x	x
Estabilidade de emulsão					x	x	x

Onde: CS - creme de soro; M - manteiga; LS - leiteiro de soro; R - retentados; LSP - leiteiro de soro em pó; LSP-EFS - leiteiro de soro em pó tratado com fluido supercrítico; LTP - leiteiro tradicional em pó.

4.7 Determinações analíticas

4.7.1 Composição centesimal

A composição centesimal foi determinada utilizando-se os métodos oficiais da AOAC (2003). O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl (métodos 930.29 e 991.20), e o teor de proteína foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total por 6,38. O teor de lipídeos foi determinado pelo método modificado de Mojonnier (métodos 932.06 e 989.05), o teor de cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla (métodos 930.30 e 945.46) e teor de sólidos totais através de secagem em estufa sob vácuo (métodos 990.19 e 990.20). O teor de lactose foi calculado por diferença, ou seja, para resultados em base seca, teor de lactose (%) = 100 – (% lipídeos + % proteínas + % cinzas).

4.7.2 Perfil lipídico (CCD)

Os perfis de lipídeos polares e não-polares das amostras foram determinados através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foram utilizadas placas de vidro (sílica-gel) específicas para CCD Merck (Darmstadt, Alemanha), tanques de corrida Kontes Glass Company (New Jersey, EUA), padrões lipídicos Sigma-Aldrich (St. Louis-MO, EUA) e solventes e outros reagentes Fisher Scientific (Tustin-CA, EUA).

Uma mistura, em partes iguais, de cinco padrões de fosfolipídeos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina e esfingomiéline) foi preparada e utilizada para identificação desses lipídeos nas amostras.

Os seguintes sistemas de solventes foram utilizados para a análise de lipídeos polares e não-polares, respectivamente: clorofórmio-metanol-água (65:25:4, v:v) e éter de petróleo-éter etílico-ácido acético (85:15:2, v:v). Todos os lipídeos foram diluídos em uma solução de clorofórmio-metanol (2:1, v:v). A mistura de padrões foi diluída a uma concentração de 0,5 mg/mL e as amostras de lipídeos, extraídos pelo método de Mojonnier, foram diluídas a uma concentração de 10 mg/mL. Para a análise, foram aplicados 20 µg da mistura de padrões e 115 µg de cada amostra de lipídeos a ser analisada. Após a corrida cromatográfica, os lipídeos foram visualizados por exposição a vapor de iodo e fotografados utilizando-se o Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules-CA, EUA).

4.7.3 Perfil protéico (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita para determinação do perfil protéico das amostras de creme de soro, leite de soro, leite de soro em pó, leite de soro em pó tratado com fluido supercrítico e leite em pó comercial. Foram utilizados célula de eletroforese Mini-Protean II, géis e demais reagentes Bio-Rad Laboratories Ltd. (Hercules-CA, EUA).

As amostras foram diluídas em água deionizada para resultar em uma concentração protéica de aproximadamente 2 mg/mL, e misturadas em proporção 1:1 (v:v) a uma solução-tampão (Laemmli *sample buffer*) contendo 5% de β-mercaptoetanol como agente redutor. As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 min e resfriadas à temperatura ambiente. Para a análise foram utilizados 10 µL de cada amostra preparada e a corrida eletroforética foi conduzida a 90 V durante a migração da amostra pelo gel de empilhamento (4% de poliacrilamida) e 120 V durante a fase de migração pelo gel de resolução (12% de poliacrilamida). O padrão de peso molecular utilizado continha 10 bandas de proteínas recombinantes de 10 kD, 15 kD,

20 kD, 25 kD, 37 kD, 50 kD, 75 kD, 100 kD, 150 kD, and 250 kD (*Precision Plus Protein Unstained Standards*), e Coomassie Brilliant Blue (R-250) foi utilizado como corante. Os géis foram fotografados utilizando o Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hercules-CA, EUA).

4.7.4 Teor de fosfolipídeos (CLAE)

Os lipídeos extraídos através do método modificado de Mojonier foram diluídos em clorofórmio-metanol (2:1, v:v) na concentração de 2 mg/mL e depois analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com o procedimento de Morin et al. (2004) para identificação e quantificação dos principais lipídeos polares contidos nas amostras. Utilizaram-se reagentes Sigma-Aldrich (St. Louis-MO, USA), incluindo os seguintes padrões de fosfolipídeos: 3-sn-fosfatidiletanolamina (FE) e 3-sn-fosfatidil-L-serina (FS) de cérebro bovino, L- α -fosfatidilinositol (FI) de fígado bovino, e L- α -fosfatidilcolina (FC) e esfingomiéline (EM) de gema de ovo.

O equipamento utilizado consistia de um cromatógrafo Hitachi HPLC System (D-7000) controlado pelo software PowerChrom (versão 2.5.1) e equipado com: bomba inteligente (Hitachi L6200) e bomba para gradiente (Hitachi L-7100) de três canais, injetor manual com alça de amostragem de 20 μ L (Rheodyne 7125), coluna analítica de sílica em fase normal (Zorbax Rx-SIL 5 μ m, 250 mm x 4,6 mm, Agilent-Technologies), pré- coluna (7,5 mm x 3,0 mm, Alltech) empacotada com o mesmo material, e detector ELSD (Evaporative Light Scattering, Sedex 55, S.E.D.E.R.E.).

Foram aplicados 20 μ l de cada amostra ou padrão e a análise foi realizada usando um gradiente binário linear com uma vazão de 1 mL/min. O eluente A consistiu de clorofórmio-metanol-hidróxido de amônio (80:19,5:0,5, v/v) e o eluente B de clorofórmio-metanol-água-hidróxido de amônio (60:34:5,5:0,5, v/v). Foi utilizado o

seguinte esquema de separação: $t_{0 \text{ min}}$ 0% B, $t_{14 \text{ min}}$ 100% B, e 100% B mantido por 9 minutos ($t_{25 \text{ min}}$). A coluna foi restaurada às condições iniciais em $t_{35 \text{ min}}$ e reequilibrada até $t_{40 \text{ min}}$. Para o detector, a pressão do gás nitrogênio no nebulizador foi mantida em 2,2 bar e a temperatura do depósito em 50 °C.

Os fosfolípidos nas amostras foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com os dos padrões, e para a quantificação foram construídas curvas de calibração utilizando as seguintes quantidades de padrões (μg), em três repetições: FE 0,5, 1, 2, 4 e 6; FI 0,5, 1, 2, 4 e 6; FS 0,5, 1, 1,5 e 2; FC 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10; EM 0,5, 1, 2, 4 e 6.

4.8 Avaliação dos produtos em pó

4.8.1 Preparo das amostras

Os pós experimentais de leiteiro de soro produzidos neste trabalho (LSP e LSP-EFS) e o pó comercial de leiteiro tradicional (LTP) foram avaliados quanto ao tamanho de partículas, estabilidade de emulsão e solubilidade protéica, utilizando-se soluções desses pós em dois pHs (5 e 7).

Para a avaliação da estabilidade de emulsão, soluções contendo 1,25% de proteína foram preparadas a partir das amostras em pó de modo que sua mistura em proporções adequadas com óleo de canola tivesse 1% de proteína e 20% de óleo (Jiménez-Flores et al., 2005). Cada amostra foi dissolvida em água deionizada suficiente para completar 90% do peso final que a solução deveria ter para atingir a concentração protéica desejada, e agitada com o auxílio de barras magnéticas por 10min. Em seguida, o pH da solução foi ajustado utilizando-se soluções 0,1 e 1 N de

HCl ou NaOH, e água deionizada foi adicionada para se chegar ao peso final desejado para a solução que, por fim, foi mantida em agitação por mais 50 min.

Para as avaliações da solubilidade protéica (Wong e Kitts, 2003) e do tamanho de partículas utilizaram-se soluções com 5% de proteína preparadas conforme descrito anteriormente.

4.8.2 Análise de tamanho de partículas

A distribuição do tamanho das partículas foi determinada utilizando-se um analisador por difração de laser (Beckman Coulter, modelo LS 230, Miami-FL, EUA). Cada solução de leite em pó foi adicionada na câmara de análise contendo um litro de água deionizada até que a obscuração requerida fosse atingida (45-55%). Os parâmetros utilizados foram: modo óptico incluindo PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering); velocidade da bomba, 10%; duração da leitura, 60 segundos; temperatura ambiente. A partir das distribuições do tamanho de partículas das soluções foram calculadas suas médias volumétricas.

4.8.3 Solubilidade protéica

As soluções de leite em pó foram submetidas à centrifugação a 12.000x g por 15 min a 25 °C (Beckman Ultracentrifuge, modelo L7-35, Miami-FL, EUA) para separação em frações solúveis e precipitados (Wong e Kitts, 2003). Os teores de proteína na solução e na porção solúvel, determinados pelo método de Kjeldahl, foram utilizados para o cálculo da solubilidade protéica seguindo a fórmula:

$$\% \text{ de proteína solúvel} = \frac{100 \times \text{quantidade de proteína na porção solúvel}}{\text{quantidade de proteína na solução}}$$

4.8.4 Estabilidade de emulsão

Emulsões do tipo óleo em água foram preparadas utilizando 40 mL de cada solução de leite em pó, em pH 7 e pH 5, contendo 1,25% de proteína e 10 mL de óleo de canola (Mazola, Bestfoods, Englewood Cliffs-NJ, EUA), resultando em uma emulsão com 1% de proteína e 20% de óleo. A mistura da solução de leite em pó e óleo de canola foi aquecida em banho-maria até atingir 55 °C (Jiménez-Flores et al., 2005) e então homogeneizada (Ultra-Turrax, modelo T18, IKA Works, Wilmington-NC, EUA) a 22.000 rpm por 2 minutos (Sodini et al., 2006).

As emulsões, imediatamente após a homogeneização, foram caracterizadas quanto ao tamanho das partículas, seguindo-se a metodologia descrita no item 4.8.2. Em seguida, cada emulsão teve sua cinética de cremeamento avaliada utilizando um analisador óptico do tipo vertical (QuickScan, Beckman Coulter, Miami-FL, EUA). Em um tubo de vidro (15 mm de diâmetro e 125 mm de altura) foram colocados 8 mL de cada emulsão para ser opticamente analisada. As emulsões foram analisadas por 6 horas a temperatura ambiente, com leitura de *back scattering* (retro-difusão da luz) no tempo zero, depois de 15 minutos e a cada 1 hora contada a partir do tempo zero.

Decorrido o tempo de análise, avaliou-se a estabilidade final das emulsões através da observação da ocorrência ou não de separação de fases. A instabilidade pode ser constatada pela ocorrência do cremeamento, ou seja, a separação de duas frações nos tubos de análise: a fração inferior, constituída por um líquido turvo semitransparente, chamada “soro”, e a fração superior, opaca e similar à emulsão

original, chamada “creme”. A altura da fração soro (A_s) e a altura total do conteúdo do tubo (A_E) foram medidas manualmente utilizando-se um escalímetro e foi calculado o índice de cremeamento (IC) utilizando-se a seguinte fórmula (Surh et al., 2006): $IC (\%) = (100 \times A_s) \times (A_E)^{-1}$. Para avaliação das amostras, considerou-se que quanto menor o índice de cremeamento, maior a estabilidade da emulsão, já que houve menor separação de soro, ou seja, maior seria a capacidade emulsificante do produto testado.

4.9 Delineamento experimental e análise estatística

Foram realizados três processamentos a partir de três bateladas diferentes de creme de soro para a obtenção dos leitelhos de soro em pó (LSP). Parte do LSP resultante de cada processo foi submetida separadamente à extração com fluido supercrítico. Os dois tipos de leitelhos em pó obtidos, LSP e LSP-EFS (submetido à EFS), e uma amostra de leitelho tradicional em pó (LTP) foram então caracterizados e avaliados em pH 5 e 7 quanto a suas propriedades funcionais utilizando um delineamento ao acaso com duas causas de variação (tipo de pó e valor de pH). Os resultados dessas análises, bem como os dados de composição dos leitelhos em pó (LSP e LSP-EFS), foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Análise de regressão foi aplicada aos dados dos padrões de fosfolípidos utilizados na CLAE para a construção das curvas de calibração. Para as análises estatísticas, utilizou-se o programa Statistica 5.5 (StatSoft, Inc, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processamento

5.1.1 Caracterização das matérias-primas

A Tabela 5 apresenta os resultados, média e desvio-padrão, das análises de composição do creme de soro, da manteiga de soro e do leiteiro de soro.

Tabela 5. Composição centesimal das matérias-primas e produtos obtidos.

Composição (%) ^{1*}	Creme de soro	Manteiga de soro	Leitelho de soro
Sólidos totais	45 ± 1	85,9 ± 0,8	8,1 ± 0,3
Lipídeos	86,1 ± 0,8	96,9 ± 0,9	16 ± 2
Proteínas	3,6 ± 0,3	0,55 ± 0,08	25 ± 2
Cinzas	3,9 ± 0,5	0,08 ± 0,01	7,0 ± 0,5
Fosfolipídeos	4,9 ± 0,5	5,1 ± 0,5	2,0 ± 0,2
Fosfolipídeos (% dos lipídeos)	5,6 ± 0,5	5,3 ± 0,5	12 ± 1

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

* Valores em base seca, exceto para sólidos totais.

Quando o creme de soro é batido separando-se leiteiro e manteiga de soro, a fase aquosa contém resíduos de triglicerídeos e de todos os componentes hidrossolúveis do creme, incluindo os fragmentos da MGGL, o que resulta em uma maior concentração de fosfolipídeos no leiteiro de soro (12%) do que na manteiga (5,3%), em relação ao teor total de lipídeos.

No presente estudo, foram obtidos CVs de 7,80% para o teor de proteínas e 0,92% para o teor de lipídeos na avaliação dos cremes de soro, e CVs de 8,11% para o teor de proteínas e 12,66% para o teor de lipídeos na avaliação dos leitelhos de soro. Essa variação nos dados de composição centesimal do creme e leitelho de soro entre os três processamentos realizados foi menor do que a obtida por Morin et al. (2006). Esses autores realizaram um estudo comparativo sobre o fracionamento de leitelho tradicional, obtido a partir de creme de leite doce, e de leitelho de soro. Nesse estudo, eles observaram variação considerável na composição do creme e do leitelho de soro entre os processamentos, especialmente nos teores de gordura, onde obtiveram coeficientes de variação (CV) de 44,25 e 84,09%, respectivamente, e também no teor de proteínas no creme de soro (CV = 40,44%). No mesmo trabalho, os autores observaram variações bem menores (CVs < 10%) em todos os componentes do creme de leite e do leitelho tradicional.

Em termos de matéria seca, os teores de proteínas, lipídeos e cinzas no creme (3,6; 86,1 e 3,9%) e no leitelho de soro (25; 16 e 7,0%) obtidos no presente trabalho foram mais próximos da composição obtida por Morin et al. (2006) para o creme e leitelho tradicionais do que para o creme e leitelho de soro. Os autores obtiveram teores de proteínas, lipídeos e cinzas no creme de 1,4%, 49,5% e 0,4% e no leitelho de soro de 13,0%, 28,9% e 5,8%, enquanto obtiveram no creme de leite 3,8%, 74,6% e 0,8% e no leitelho tradicional 25%, 12,2% e 5,6%, respectivamente.

Quanto ao teor de fosfolipídeos, Morin et al. (2006) não determinaram os teores nos cremes e manteigas, mas os teores obtidos no presente estudo foram superiores aos apresentados por esses autores para os leitelhos tradicional e de soro, tanto como percentual dos sólidos totais (2,0%) quanto como percentual de lipídeos totais (12%). No trabalho de Morin et al. (2006), o leitelho tradicional continha 1,2% e 9,8% de fosfolipídeos como % dos sólidos totais e dos lipídeos totais, respectivamente, enquanto o leitelho de soro continha 1,3% e 4,5% de fosfolipídeos como % dos sólidos totais e dos lipídeos totais, respectivamente.

Essa variabilidade na composição dos produtos entre os trabalhos pode ser decorrente de diferenças em suas origens, por exemplo, o creme de soro pode ter sido obtido a partir do soro resultante da produção de tipos de queijos diferentes. A composição da manteiga foi similar em ambos os trabalhos, indicando que a composição inicial do creme tem um efeito maior na composição do leite do que na da manteiga.

5.1.2 Filtração em membrana

O fluxo de permeado durante o processo de filtração (Tabela 6) foi inicialmente de $45 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ e caiu cerca de 26% durante a fase de ultrafiltração. Com o início da fase de diafiltração, o fluxo aumentou gradativamente atingindo $36 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ao final do processo, o que representou cerca de 81,9% do fluxo inicial. O fluxo médio transmembrana foi de 34 e $30 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ durante as fases de UF e DF, respectivamente, sendo que a média, considerando todo o processo, foi de $31 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. No início da filtração parte dos sólidos do leite de soro tende a ficar retido na superfície ou nos poros da membrana, reduzindo o fluxo de permeado. Quando se inicia a fase de diafiltração, a água adicionada redilui continuamente o retentado e remove parte dos componentes do leite que estariam entupindo os poros da membrana, melhorando assim o fluxo transmembrana.

Morin et al. (2006) compararam o fracionamento de leites tradicionais e de soro por microfiltração (MF) à baixa temperatura ($8-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$) utilizando de 0,80-0,95 bar de pressão transmembrana, e obtiveram fluxos transmembrana médios de 23 e $26 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ durante as fases de MF e DF do leite de soro, respectivamente. Esses valores foram mais baixos do que os obtidos no presente trabalho, apesar dos autores utilizarem membranas com poros maiores ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$), provavelmente devido às temperaturas utilizadas, já que baixas temperaturas aumentam a densidade e viscosidade de fluidos e reduzem a difusividade de solutos (Cheryan, 1998), dificultando o fluxo de componentes transmembrana.

Tabela 6. Fluxo transmembrana (FTM) durante o processo de filtração.

Etapa	FTM (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	FTM relativo (%)
Início UF	45 ± 6 ¹	100,00
1DF	33 ± 4	73 ± 5
2DF	34 ± 6	76 ± 8
3DF	33 ± 5	77 ± 8
4DF	37 ± 5	82 ± 6
5DF	37 ± 4	82 ± 7
Fim DF	36 ± 4	82 ± 7
Fluxo médio* UF	34 ± 7	75 ± 5
DF	30 ± 5	68 ± 7
Geral	31 ± 5	69 ± 6

* Fluxo médio = total de permeado/tempo de filtração/area da membrana.

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

As mudanças na concentração de componentes do retentado durante o processo de filtração estão ilustradas na Figura 8. O processo concentrou lipídeos e proteínas no retentado, enquanto outros componentes foram removidos no permeado. Durante a UF até a segunda DF, o comportamento de concentração de lipídeos e proteínas foi similar, porém, a partir daí, os lipídeos continuaram a serem concentrados e observou-se uma redução no teor de proteína total, significando que parte dos compostos nitrogenados estava sendo retido/adsorvido na membrana ou perdido para o permeado.

Fenômeno semelhante foi observado por Morin et al. (2006) durante a microfiltração de leite de soro. Os autores obtiveram uma taxa de passagem constante de lipídeos através da membrana, enquanto a passagem de proteínas variou ao longo do processo, sendo que a maior parte das proteínas encontradas no permeado de filtração do leite de soro era constituída de soro-proteínas. Essa redução no teor total de proteínas durante a diafiltração no presente trabalho,

possivelmente foi decorrente da perda de compostos nitrogenados no permeado, já que estes são hidrossolúveis, e da retenção de proteínas do soro na membrana. No presente estudo, os permeados foram coletados para serem analisados posteriormente, porém o baixo teor de sólidos totais (<0,5%), constituídos essencialmente de lactose e minerais, da maioria dessas amostras impossibilitou a realização de análises que pudessem ter resultados confiáveis.

Apesar da perda de proteínas na fase de diafiltração, a filtração aumentou a concentração de proteínas no produto em cerca de 100% e de lipídeos em 200%, enquanto o conteúdo mineral foi reduzido em 74%. Morin et al. (2006) também obtiveram um aumento maior na concentração de lipídeos (130%) do que de proteínas (62%) no retentado final em relação ao leite de soro inicial.

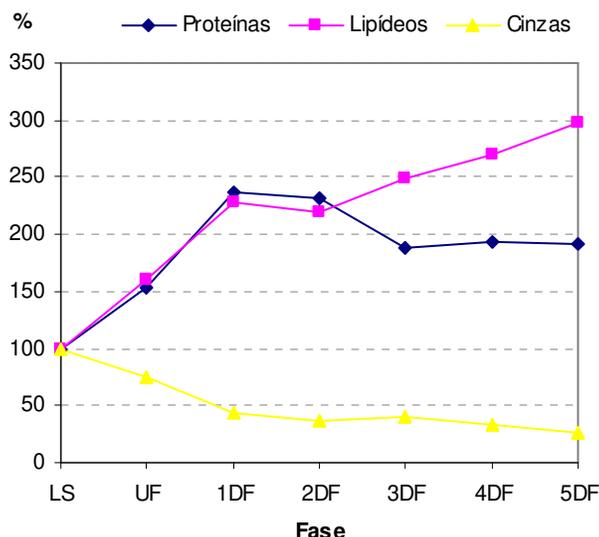


Figura 8. Composição centesimal relativa (% em base seca) dos retentados de filtração em membrana.

A composição centesimal do leite de soro sofreu modificação significativa durante a filtração em membrana (Tabela 7), especialmente durante a etapa de diafiltração. Os teores de cinzas e lactose passaram, respectivamente, de 7,0 e 54%

no leiteiro de soro para 5,3 e 31% após a UF, e para 1,8 e 2,2% ao final da DF. A ultrafiltração não alterou a razão entre o conteúdo de lipídeos e proteínas do leiteiro, a qual foi mantida em 1:1,5. Por outro lado, durante a diafiltração houve um aumento maior no teor de lipídeos do que no teor de proteínas, chegando a uma razão de 1:1 entre esses componentes no retentado final (5DF). Resultados semelhantes foram obtidos por Astaire (2002) microfiltrando leiteiro tradicional a 4 °C. Entretanto, quando a autora utilizou 50 °C ocorreu aumento na concentração de proteínas e cinzas, mas também grande redução no teor de lipídeos.

Tabela 7. Composição centesimal, em base seca, dos retentados de filtração em membrana.

Composição (%)¹	Proteínas	Lipídeos	Cinzas	Lipideo:Proteína
UF	38 ± 8 ^b	26 ± 5 ^c	5,3 ± 0,3 ^a	1:1,5
1DF	59 ± 2 ^a	37 ± 3 ^b	3 ± 1 ^b	1:1,6
2DF	58 ± 10 ^a	36 ± 9 ^{bc}	2 ± 1 ^b	1:1,6
3DF	47 ± 7 ^a	45 ± 6 ^{ab}	2 ± 1 ^b	1:1,2
4DF	48 ± 6 ^a	44 ± 6 ^{ab}	2,3 ± 0,8 ^b	1:1,1
5DF	48 ± 6 ^a	48 ± 6 ^a	1,8 ± 0,5 ^b	1:1

^{ab} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

5.1.3 Extração com fluido supercrítico

Após a filtração em membrana, o leiteiro de soro concentrado foi transformado em pó através de secagem em spray e depois submetido à extração supercrítica (EFS), visando a remoção de triglicerídeos. As condições de operação do equipamento são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. Condições de operação do equipamento de extração supercrítica.

Parâmetro	Condição Programada	Condição Obtida ¹
Trocador de calor, °C	50	45,6 ± 0,8
Aquecedor da câmara, °C	50	55,6 ± 0,2
Aquecedor do ciclone, °C	50	54 ± 2
T° Fundo da câmara, °C	-	44,9 ± 0,8
T° Topo da câmara, °C	-	56 ± 1
Regulador de contra-pressão, bar	350	350,1 ± 0,5
Vazão de CO ₂ , g/min	20	19 ± 1

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

O desempenho da extração com fluido supercrítico está sumarizado na Tabela 9. O processo removeu aproximadamente 34 g de lipídeos apolares para cada 100 g de amostra, utilizando cerca de 97 g de CO₂ para remover cada grama desse material. Essa remoção correspondeu a uma redução de 73% na quantidade de lipídeos originalmente presente na amostra.

Astaire (2002) e Astaire et al. (2003) aplicaram EFS em retentados de leiteiro tradicional em pó, mas a amostra foi inicialmente misturada com biosilicato para melhorar a eficiência de extração e a temperatura utilizada foi de 77 °C. Em sua tese (Astaire, 2002), a autora obteve uma redução de 73% no teor de lipídeos do leiteiro tradicional em pó (MF/5DF) após a aplicação de EFS. O procedimento utilizado no presente trabalho utilizou temperatura de 50 °C para evitar a desnaturação das proteínas do soro, presentes em maior proporção no leiteiro de soro do que no leiteiro tradicional e que podem ser desnaturadas à 77 °C. Também não foi misturado biosilicato às amostras, já que a presença desse material nos pós depois da extração prejudicaria a utilização do produto final como ingrediente. Nessas condições, no presente trabalho a redução no teor médio de lipídeos nos leitelhos em pó foi de 55,4%.

Tabela 9. Desempenho da extração supercrítica.

Parâmetro	Valores Obtidos¹
Lipídeos removidos (g em 100g de amostra)	34 ± 2
Lipídeos removidos (g em 100g de lipídeos)	73 ± 4
g CO ₂ / g lipídeo removido	97 ± 4

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

Conforme o esperado, a extração utilizando CO₂ supercrítico removeu seletivamente lipídeos apolares, como demonstrado na Figura 9. Na cromatografia em camada delgada (CCD), foi analisada a mesma quantidade de lipídeos de cada amostra e no cromatograma pode ser visto claramente que a gordura removida pela extração supercrítica não continha lipídeos polares (linhas 7 e 8), os quais apresentaram um aumento de concentração nos pós depois da extração (linhas 4, 5 e 6), quando comparados ao leiteiro de soro em pó não tratados (linhas 1, 2 e 3).

Apesar da concentração de ácidos graxos específicos não ter sido avaliada no presente trabalho, resultados obtidos por Astaire et al. (2003) permitem supor que a maior parte dos triglicerídeos removidos pela extração supercrítica era possivelmente constituída por ácidos graxos de cadeia curta e média. Em seu estudo, os autores observaram que os lipídeos contendo ácidos graxos de cadeia curta e média (\leq C18:1) tiveram sua concentração reduzida nos pós submetidos à EFS, enquanto lipídeos contendo ácidos graxos de cadeia longa (C18:2 a C24) tiveram a concentração aumentada, indicando que os triglicerídeos possuem diferentes solubilidades em CO₂ supercrítico de acordo com seu tipo de cadeia e peso molecular.

A remoção seletiva de lipídeos contendo ácidos graxos de cadeia curta e média e a permanência de lipídeos contendo ácidos graxos polinsaturados podem ser consideradas efeitos positivos da extração utilizando CO₂ supercrítico, já que ácidos graxos polinsaturados têm sido considerados lipídeos benéficos à saúde humana (Haug et al., 2007).

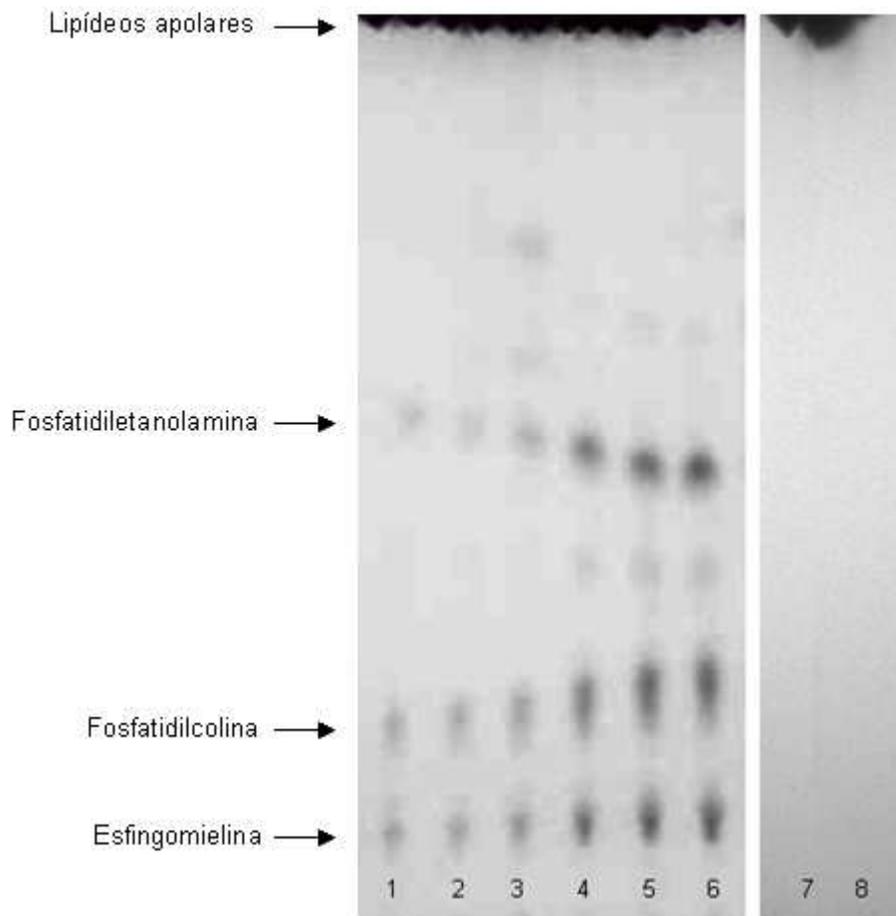


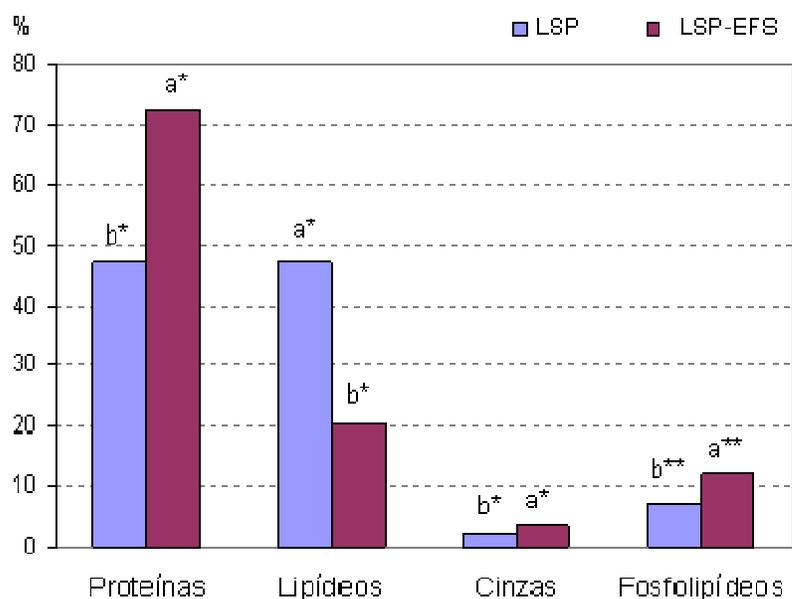
Figura 9. Perfis de lipídeos polares obtidos através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Linhas: 1-3: leitelhos de soro em pó (LSP) dos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente; 4-6: LSP dos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente, submetidos à extração supercrítica (LSP-EFS); 7-8: gordura removida por EFS.

5.1.4 Caracterização inicial dos leitelhos em pó

Em consequência da remoção de lipídeos apolares, houve redução no teor total de lipídeos ($p < 0,05$), com um aumento proporcional nos dos teores médios dos demais componentes do leitelho de soro em pó (Figura 10), sendo mais expressivo

para proteínas e cinzas ($p < 0,05$) do que para os fosfolipídeos ($p < 0,07$). Os teores médios de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos e cinzas passaram de $47 \pm 3\%$, $47 \pm 4\%$, $7 \pm 4\%$ e $2,3 \pm 0,1\%$ nos leitelhos de soro em pó antes da extração para $73 \pm 3\%$, $21 \pm 4\%$, $12 \pm 4\%$ e $3,2 \pm 0,2\%$ nos pós depois da extração supercrítica, respectivamente. Assim, a proporção lipídeo:proteína foi reduzida de 1:1 para 1:3,5 enquanto a de fosfolipídeo:lipídeo aumentou de 1:6,6 para 1:1,7.

Morin et al. (2006) obtiveram pós com menores teores de proteínas (21%) e de fosfolipídeos (2%) e maiores de lipídeos (67%), cinzas (6,7%) e lactose (5%) a partir de um retentado de MF/2DF de leite de soro filtrado a 8-10 °C, demonstrando que a associação dos perfis iniciais da matéria-prima e das condições utilizadas no presente trabalho resultaram em leitelhos de soro em pó com melhores características para serem utilizados para a obtenção de um ingrediente rico em fosfolipídeos.



^{ab} Para cada componente, médias com letras diferentes diferem estatisticamente (* $p < 0,05$; ** $p < 0,07$).

Figura 10. Composição centesimal (% em base seca) dos leitelhos de soro em pó antes (LSP) e depois da extração supercrítica (LSP-EFS).

Os perfis protéicos das amostras de leite de soro (LS), leite de soro em pó (LSP), leite de soro em pó após a extração supercrítica (LSP-EFS) e leite em pó comercial (LTP) obtidos através de SDS-PAGE são mostrados na Figura 11.

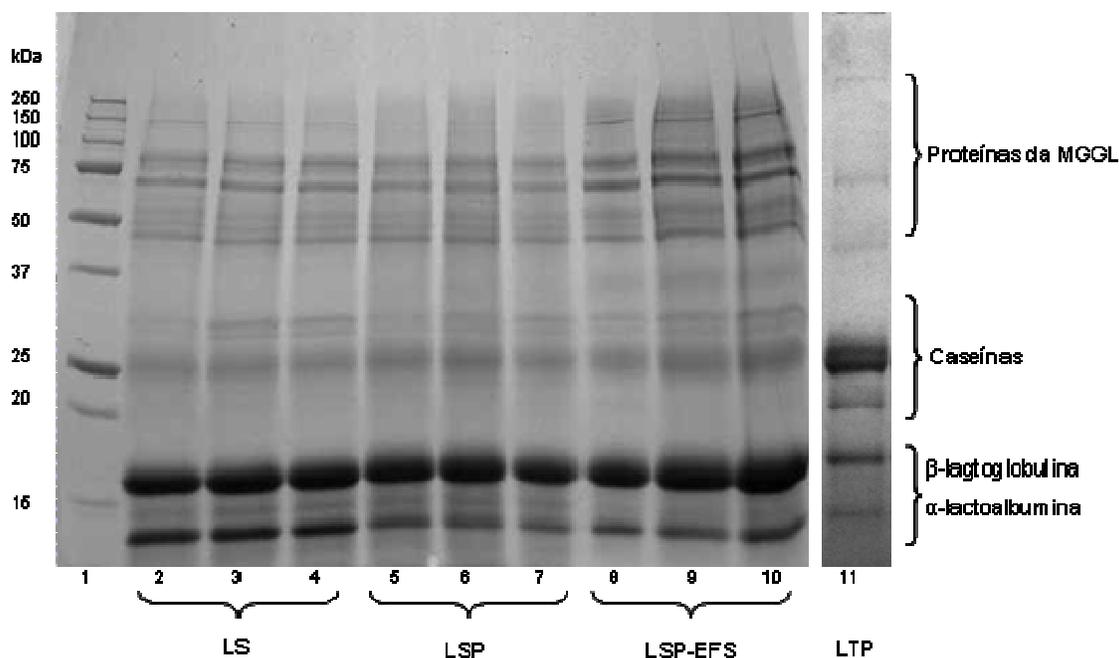


Figura 11. Perfis protéicos obtidos por SDS-PAGE. Linhas: 1 padrões de peso molecular; 2-4 leitelhos de soro (LS) dos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente; 5-7 leitelhos de soro em pó (LSP) dos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente; 8-10 LSP dos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente, submetidos à extração supercrítica (LSP-EFS); 11 leite tradicional em pó (LTP). Para os leitelhos de soro, LSPs e LTP foram preparadas soluções de modo que ao final as amostras apresentassem 1 mg proteína/mL, enquanto para os LSP-EFSs foram preparadas soluções com as mesmas quantidades de pó utilizadas para os LSPs.

Pode ser observado claramente que todas as amostras apresentaram três grupos de proteínas: as originárias da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL), as caseínas e as principais proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina). Porém, as amostras derivadas de creme de soro (LS, linhas 2-4, LSP, linhas 5-7, e LSP-EFS, linhas 8-10) continham, proporcionalmente, pouca

caseína e quantidades muito maiores de proteínas derivadas da MGGL e do soro em relação à amostra de leite tradicional em pó (linha 11), o qual parece ter as caseínas como o principal componente protéico. Sodini et al. (2006), analisando diversos leitelhos em pó através de SDS-PAGE, obteve perfis protéicos para leitelhos tradicionais em pó bastante semelhante ao LTP analisado no presente estudo. Entretanto, o leite de soro em pó avaliado por esses autores apresentou uma proporção menor de proteínas da MGGL do que os produzidos no presente estudo.

Essa diferença entre a composição protéica do leite de soro e do leite de creme ocorre porque durante a fabricação de queijo praticamente toda a caseína é concentrada na massa por processos físicos e químicos que deixam um residual mínimo de caseína perdido no soro. Por outro lado, o creme é separado do leite por centrifugação, um processo físico baseado na diferença de densidade entre a gordura e os demais componentes do leite, o que acaba carregando um percentual relativamente grande de caseínas para o creme.

A filtração em membrana reduziu a proporção de α -lactoalbumina em relação às demais proteínas, indicando que essa proteína pode ter sido o principal componente protéico retido na membrana. Já a extração supercrítica provocou a concentração das proteínas nos pós, em decorrência da remoção parcial dos lipídeos apolares pelo CO₂ supercrítico, como já discutido anteriormente.

Através dos dados apresentados na Tabela 10, a qual mostra o fator de concentração dos componentes do leite de soro no decorrer de todas as fases de processamento, é possível visualizar como as características de composição dos produtos foram sendo modificadas ao longo do processo de obtenção dos leitelhos em pó.

Tabela 10. Fator de concentração (FC) dos componentes do leiteiro de soro nas diferentes fases de processamento.

FC ^{1*}	Retentado UF	Retentado 5DF	LSP	LSP-EFS
Sólidos totais	1,19 ± 0,03 ^b	0,6 ± 0,2 ^b	12,2 ± 0,6 ^a	11,9 ± 0,5 ^a
Proteínas	1,5 ± 0,2 ^c	1,9 ± 0,1 ^b	1,91 ± 0,08 ^b	2,9 ± 0,1 ^a
Lipídeos	1,59 ± 0,09 ^b	3,0 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,2 ^a	1,17 ± 0,08 ^b
Fosfolipídeos	-	-	4 ± 2 ^{b*}	6 ± 2 ^{a*}
Cinzas	0,759 ± 0,004 ^a	0,26 ± 0,07 ^c	0,33 ± 0,01 ^c	0,46 ± 0,01 ^b
Lactose	0,6 ± 0,1 ^a	0,04 ± 0,02 ^b	0,06 ± 0,01 ^b	0,09 ± 0,02 ^b

* FC = (concentração do componente) x (concentração do componente no leiteiro de soro)⁻¹. Valores em base seca, exceto para sólidos totais.

^{abc} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,05, *p<0,18).

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

LSP: leiteiro de soro em pó; LSP-EFS: LSP submetido à extração supercrítica.

A concentração de compostos de interesse no presente trabalho foi superior à obtida por Morin et al. (2006), especialmente com relação ao teor de fosfolipídeos, mesmo quando comparada aos dados obtidos antes da extração supercrítica. Esses autores, trabalhando com MF/2DF de leiteiro de soro a 8-10 °C conseguiram aumentar em 62, 131, 51 e 16% os teores de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos e cinzas, respectivamente, e reduzir o teor de lactose em 90%.

No presente estudo, depois dos processos de filtração e secagem, os teores de cinzas e lactose foram reduzidos para 33 e 6% dos teores iniciais encontrados no leiteiro de soro, enquanto os teores de proteínas, lipídeos e fosfolipídeos foram aumentados em cerca de 90, 190 e 300%, respectivamente. Já o processo de extração com CO₂ supercrítico reduziu em média 60% o FC de lipídeos nos pós, resultando ao final de todo o processamento em aumentos de 190, 17 e 500% nos teores de proteínas, lipídeos e fosfolipídeos, e uma redução de 54 e 91% nos teores de cinzas e de lactose, respectivamente, em relação aos teores, em base seca, do leiteiro de soro.

5.1.5 Teores de fosfolipídeos específicos

Nas amostras analisadas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), foram identificados e quantificados cinco principais fosfolipídeos: fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), esfingomiéline (EM), fosfatidilinositol (FI) e fosfatidilserina. A partir dos dados obtidos, foram construídas curvas-padrões e geradas regressões lineares para a quantificação de cada fosfolipídeo. Os coeficientes das equações para quantificação desses fosfolipídeos são apresentados na Tabela 11. A soma dos teores dos cinco fosfolipídeos identificados foi considerada como sendo o total de fosfolipídeos, já que outros lipídeos representariam apenas traços desse total (Dewettinck et al., 2008; Fong et al., 2007; Kanno, 1990).

Tabela 11. Coeficientes das equações para quantificação dos fosfolipídeos dos produtos analisados por HPLC.

Fosfolipídeos	FE	FI	FS	FC	EM
Parâmetros estatísticos					
Coeficiente angular (A)	2,7432	3,56	0,4673	2,6757	2,6187
Coeficiente linear (B)	0,9426	1,145	0,1008	1,352	0,8576
Coeficiente de determinação (R²)	0,9963	0,9936	0,9909	0,9968	0,9949
Significância (p)	<1 x 10 ⁻⁵	<3 x 10 ⁻⁴	<5 x 10 ⁻³	<2 x 10 ⁻⁷	<2 x 10 ⁻⁴
Faixa linear (mg/ml)	0,025-0,3	0,025-0,3	0,025-0,1	0,025-0,5	0,025-0,3

Onde: Quantidade do fosfolipídeo (μg) = (área + B) x A⁻¹

FE: fosfatidiletanolamina; FI: fosfatidilinositol; FS: fosfatidilserina; FC: fosfatidilcolina; EM: esfingomiéline.

A Tabela 12 mostra os teores calculados de fosfolipídeos das amostras analisadas, como percentuais do total de lipídeos, do total de fosfolipídeos e dos sólidos totais.

Tabela 12. Teores de fosfolipídeos¹ dos produtos analisados por HPLC.

Fosfolipídeos	Amostras					
	CS	Manteiga	LS	LSP	LSP-EFS	LTP
Como % do teor de fosfolipídeos						
FC	34 ± 5	33 ± 4	45 ± 8	43 ± 24	44 ± 17	53,7 ± 0,5
FE	18 ± 1	17,7 ± 0,80	18 ± 7	22 ± 11	22 ± 8	11,0 ± 0,6
EM	22 ± 3	22 ± 3	22 ± 3	24 ± 13	24 ± 9	27,3 ± 0,6
FI	15,4 ± 0,4	15,7 ± 0,4	7,1 ± 0,8	6 ± 1	5 ± 3	2,84 ± 0,02
FS	11 ± 3	12 ± 3	8 ± 2	6 ± 3	5 ± 3	5,1 ± 0,5
Como % do teor de lipídeos						
FC	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2	6 ± 1	6 ± 3	27 ± 5	15,7 ± 0,1
FE	1,00 ± 0,06	0,94 ± 0,05	2,1 ± 0,7	3 ± 1	13 ± 2	3,2 ± 0,2
EM	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	3 ± 2	15 ± 3	8,0 ± 0,2
FI	0,87 ± 0,02	0,84 ± 0,02	0,88 ± 0,04	0,9 ± 0,1	3 ± 1	0,83 ± 0,01
FS	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,4	3 ± 2	1,5 ± 0,1
Total (%)	5,6 ± 0,5	5,3 ± 0,5	12,4 ± 0,8	15 ± 7	61 ± 11	29,2 ± 0,6
Como % do teor de sólidos totais						
FC	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2	3 ± 2	5 ± 2	0,98 ± 0,01
FE	0,86 ± 0,05	0,91 ± 0,04	0,3 ± 0,1	1,5 ± 0,8	2,6 ± 0,9	0,20 ± 0,01
EM	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,44 ± 0,06	1,7 ± 0,9	3 ± 1	0,50 ± 0,01
FI	0,75 ± 0,02	0,81 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,45 ± 0,08	0,6 ± 0,3	0,052 ± 0,003
FS	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,16 ± 0,04	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,09 ± 0,01
Total (%)	4,9 ± 0,4	5,1 ± 0,5	2,0 ± 0,2	7 ± 4	12 ± 4	1,83 ± 0,04

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios (n=3)

Onde: Amostras: CS - creme de soro, LS - leiteiro de soro, LSP - leiteiro de soro em pó, LSP-EFS - leiteiro de soro em pó submetido à extração supercrítica, LTP - leiteiro tradicional em pó. Fosfolipídeos: FC - fosfatidilcolina, FE - fosfatidiletanolamina, EM - esfingomielina, FI - fosfatidilinositol, FS - fosfatidilserina.

Conforme esperado, a maior parte dos fosfolipídeos foi constituída por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline, os quais representaram, respectivamente, de 34 a 45%, de 18 a 22% e de 22 a 24% do total de fosfolipídeos nas amostras de creme de soro e derivados, enquanto fosfatidilinositol e fosfatidilserina somaram de 5 a 16% e de 5 a 12%, respectivamente. Já na amostra comercial de leiteiro tradicional em pó, FC, FE e EM representaram 54; 11 e 27%, enquanto FI e FS somaram 3 e 5%, respectivamente.

O total de fosfolipídeos, como percentual dos sólidos totais, presente no leiteiro de soro foi de 2%. Morin et al. (2006), Rombaut et al. (2006) e Sachdeva and Buchheim (1997) encontraram concentrações menores de fosfolipídeos no leiteiro de soro, 1,3; 1,8 e 1,5%, respectivamente. Os autores não apresentaram os teores individuais de cada fosfolipídeo. Não foi encontrado nenhum trabalho apresentando esse tipo de dado para creme, manteiga e leiteiro de soro.

Dados sobre fosfolipídeos específicos foram publicados recentemente por Britten et al. (2008), porém dizem respeito aos teores de fosfolipídeos de leiteiro tradicional. Os autores obtiveram que fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, fosfatidilinositol e fosfatidilserina representavam 25; 29; 27; 9 e 10% do total de fosfolipídeos, respectivamente. No estudo citado, FC, FE e SM apresentaram-se em proporções semelhantes (25-29%), enquanto que no presente trabalho foi observada uma grande proporção de FC no leiteiro de soro (~45% do total) em relação aos demais fosfolipídeos.

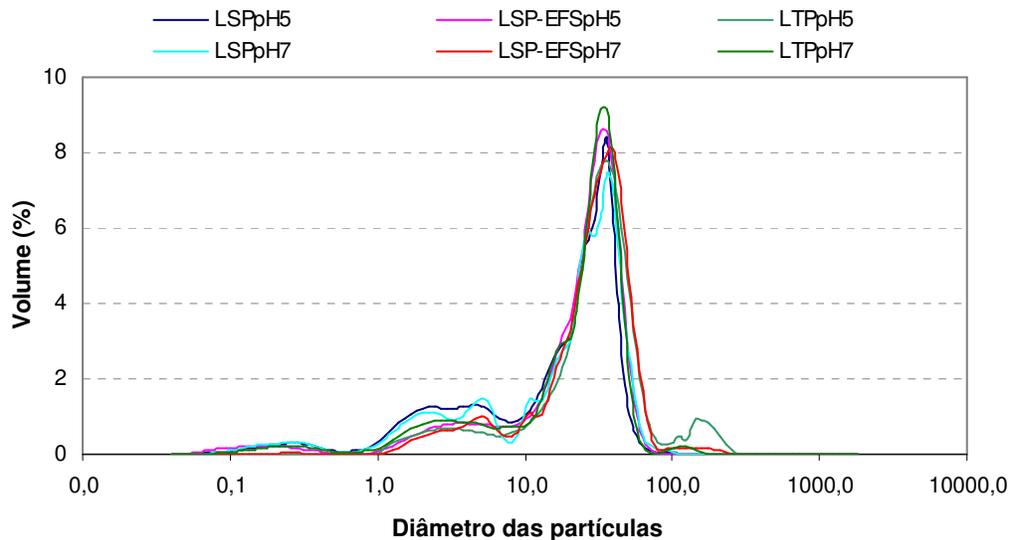
5.2 Avaliação das Propriedades Funcionais

5.2.1 Solubilidade protéica

A solubilidade protéica das amostras de leitelhos em pó foi avaliada em soluções contendo 5% de proteína e preparadas em pH 5 e 7. Antes de iniciar a análise de solubilidade, as soluções protéicas foram analisadas quanto à distribuição do tamanho de partículas (Figura 12). Podem ser feitas quatro observações principais com relação às distribuições de tamanho de partículas das soluções: (1) todas as soluções apresentaram a grande maioria (69-84%) de suas partículas com tamanho, em percentual volumétrico, entre 10 e 100 μm ; (2) a solução de LTP em pH 5 foi a que apresentou a quantidade mais elevada de partículas maiores do que 100 μm ; (3) as soluções de LSP, independente do pH, apresentaram as quantidades mais baixas de partículas menores do que 10 μm ; e (4) as soluções de LSP-EFS, de maneira geral, mostraram um perfil de distribuição de tamanho de partículas intermediário em relação aos das demais soluções.

Houve influência significativa do pH ($p < 0,05$) e do tipo de pó ($p < 0,05$) no tamanho volumétrico médio das partículas. Em pH 5, as soluções de LTP apresentaram o maior tamanho médio das partículas. Em pH 7 as soluções de LSP-EFS apresentaram partículas com maior tamanho médio (33 μm) em relação às soluções de LSP (25 μm), enquanto as soluções de LTP não diferiram das demais.

O pH afetou o tamanho médio das partículas principalmente nas soluções de LTP, o qual foi reduzido de 40 μm para 27 μm quando o pH passou de 5 para 7, provavelmente porque o LTP contém uma quantidade significativa de caseína (Figura 10), a qual tende a se agregar quando o pH se aproxima de seu ponto isoelétrico (~4,6).



	<1 µm	1-10 µm	10-100 µm	>100 µm	Média
pH5: LSP	4,6 ± 0,8 ^{aA}	26 ± 1 ^{aA}	69,4 ± 0,3 ^{bA}	0,1 ± 0,1 ^{bA}	23 ± 1 ^{bA}
LSP-EFS	4 ± 1 ^{aA}	16 ± 1 ^{bA}	80,6 ± 0,1 ^{aA}	0,002 ± 0,001 ^{bA}	27,0 ± 0,8 ^{bB}
LTP	0,02 ± 0,01 ^{bA}	13,1 ± 0,4 ^{bB}	80,7 ± 0,2 ^{aA}	6,1 ± 0,7 ^{aA}	40,0 ± 0,9 ^{aA}
pH7: LSP	5 ± 1 ^{aA}	22 ± 4 ^{aA}	73 ± 4 ^{aA}	0,1 ± 0,2 ^{aA}	25 ± 4 ^{bA}
LSP-EFS	0,4 ± 0,5 ^{bB}	14 ± 2 ^{aA}	84 ± 2 ^{aA}	1 ± 1 ^{aA}	33 ± 4 ^{aA}
LTP	3 ± 1 ^{aA}	17,7 ± 0,8 ^{aA}	78 ± 1 ^{aA}	1 ± 1 ^{aB}	27 ± 2 ^{abB}

^{ab} Para cada valor de pH, médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{AB} Para cada tipo de pó, médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios ($n=3$)

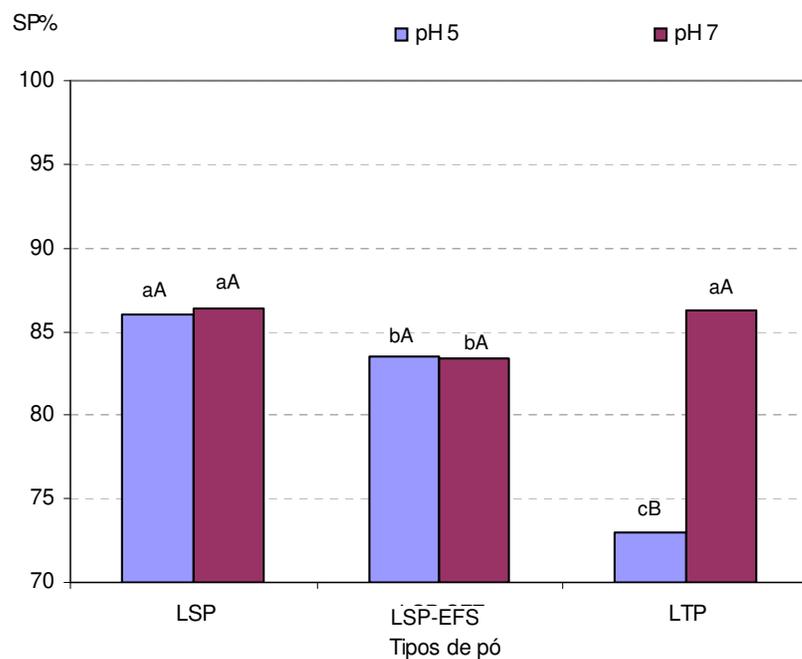
Figura 12. Distribuição do tamanho de partículas¹ (volume, %) determinada em soluções com 5% de proteína preparadas em pH 5 e 7.

O LSP não foi afetado pelo pH, pois a maior parte de seu teor protéico é formado por proteínas do soro, as quais não se agregam quando o pH se torna mais ácido. Nesse tipo de pó, a extração supercrítica levou a um leve aumento do tamanho médio das partículas nas soluções em pH 7, e redução no percentual de partículas menores do que 1 µm em pH 5 e 7.

O mesmo efeito da EFS foi reportado por Astaire (2002) avaliando leitelhos tradicionais em pó. A autora atribuiu esse efeito ao fato de que a extração supercrítica havia removido preferencialmente lipídeos apolares saturados e de cadeia curta (partículas menores), contribuindo assim para o aumento do tamanho médio das partículas em solução. Além disso, Ju & Kilara (1998) demonstraram que as proteínas do soro podem sofrer mudanças de conformação e agregação em soluções quando submetidas a aquecimento leve (45 °C) por algumas horas, o que pode ter acontecido no presente trabalho durante a extração com fluido supercrítico, levando ao aumento do tamanho das partículas.

Como mostra a Figura 13, o pH não afetou a solubilidade protéica dos leitelhos de soro em pó, tratados ou não com EFS, e afetou significativamente essa característica nas soluções de leite tradicional em pó. O mesmo foi observado por Sodini et al. (2006). Os autores obtiveram solubilidades protéicas em torno de 79 e 77% em pH original (6,0 para LSP e 6,6 para LTP) e de 23 e 76% em pH 5, analisando soluções de leite tradicional e leite de soro em pó, respectivamente.

No LTP, a redução do pH de 7 para 5 levou à redução da solubilidade protéica de $86,2 \pm 0,3\%$ para $73,0 \pm 0,6\%$, possivelmente devido à diminuição da solubilidade das caseínas com a queda do pH. As soluções de LSP-EFS apresentaram valores de solubilidade praticamente iguais em pH 5 ($83,5 \pm 0,7\%$) e pH 7 ($83,4 \pm 0,4\%$). Em pH 7, sua solubilidade protéica foi menor do que as demais soluções (LSP = $86,4 \pm 0,5\%$; LTP = $86,2 \pm 0,3\%$), as quais não diferiram entre si, e menor do que a de LSP em pH 5 ($86,0 \pm 0,3\%$).



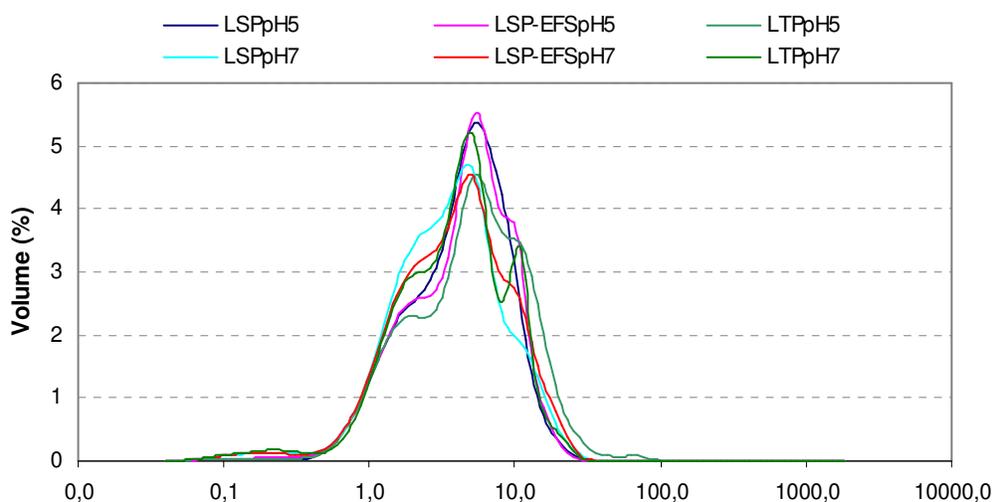
^{abc} Para cada valor de pH, médias com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
^{AB} Para cada tipo de pó, médias com letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Figura 13. Solubilidade protéica (SP%) dos leitelhos de soro em pó determinada em soluções com 5% de proteína preparadas em pH 5 e 7.

O aumento do tamanho das partículas e a redução da solubilidade das proteínas nos leitelhos em pó tratados por EFS podem ser decorrentes da exposição prolongada ao aquecimento leve durante a extração (Ju & Kilara, 1998), conforme explicado anteriormente.

5.2.2 Testes de emulsificação

A estabilidade das emulsões das amostras de leite em pó foi avaliada em emulsões contendo 1% de proteína e 20% de óleo, preparadas em pH 5 e 7. Antes de iniciar os testes de emulsificação, as emulsões foram analisadas quanto à distribuição do tamanho de partículas (Figura 14).



	Diâmetro das partículas				Média
	<1 µm	1-10 µm	10-100 µm	>100 µm	
pH5: LSP	5,6 0,4 ^{ab}	85 ± 1 ^{aA}	9,0 ± 0,7 ^{bA}	0 ± 0 ^{aA}	5,46 ± 0,01 ^{bA}
LSP-EFS	5,9 0,6 ^{aA}	83 ± 1 ^{aA}	11 ± 2 ^{bA}	0 ± 0 ^{aA}	5,7 ± 0,3 ^{bA}
LTP	5 1 ^{aA}	74 ± 2 ^{bA}	20,7 ± 0,6 ^{aA}	0,01 ± 0,01 ^{aA}	7,3 ± 0,6 ^{aA}
pH7: LSP	7,3 0,2 ^{aA}	83 ± 3 ^{aA}	10 ± 3 ^{aA}	0 ± 0 ^{aA}	5,1 ± 0,5 ^{aA}
LSP-EFS	7,2 0,6 ^{aA}	80,3 ± 0,7 ^{aA}	13 ± 1 ^{aA}	0 ± 0 ^{aA}	5,5 ± 0,4 ^{aA}
LTP	6,8 0,5 ^{aA}	81 ± 3 ^{aA}	12 ± 2 ^{aB}	0 ± 0 ^{aA}	5,4 ± 0,5 ^{aB}

^{ab} Para cada valor de pH, médias com letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{AB} Para cada tipo de pó, médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

¹ Médias ± desvios-padrão de três ensaios ($n=3$)

Figura 14. Distribuição do tamanho de partículas¹ (volume, %) determinada em emulsões (20% óleo, 1% proteína) preparadas em pH 5 e 7.

Todas as emulsões apresentaram a grande maioria de suas partículas (74-85%) com tamanho, em percentual volumétrico, entre 1 e 10 μm . As únicas diferenças encontradas foram: (1) em pH 5 as emulsões de LTP apresentaram um quantidade superior de partículas entre 10 e 100 μm (20,7%) em relação às emulsões de LSP (9%) e de LSP-EFS (11%), as quais não diferiram entre si; e (2) o pH só afetou significativamente o tamanho das partículas das emulsões de LTP, as quais apresentaram maior quantidade de partículas entre 10 e 100 μm e maior média (7,3 μm) em pH 5 do que em pH 7 (12%; 5,4 μm).

Efeitos similares foram observados por Sodini et al. (2006) em emulsões de leiteiro tradicional e de leiteiro de soro em pó. Os autores verificaram que o pH não teve efeito sobre as emulsões de LSP (média $\sim 5 \mu\text{m}$), enquanto as emulsões de leiteiro tradicional em pó apresentaram partículas maiores em pH 5 ($\sim 13 \mu\text{m}$) do que no pH original da emulsão ($\sim 7,5 \mu\text{m}$). Esse efeito pode ser atribuído novamente ao alto teor de caseínas no leiteiro tradicional e baixo residual dessas proteínas insolúveis em pH 4,6 no leiteiro de soro.

A estabilidade das emulsões foi avaliada através das cinéticas de cremeamento das mesmas mantidas em temperatura ambiente durante seis horas. Após seis horas, foi calculado o índice de cremeamento para cada emulsão (Tabela 13) e o aspecto final das emulsões pode ser observado na Figura 15. Como pode ser observado na Tabela 13, alguns valores de desvio-padrão foram altos em relação à da média, o que não comprometeu a avaliação geral dos resultados. Isso ocorreu devido a pouca quantidade de soro separada, especialmente nas emulsões de LSP e LSP-EFS, o que dificultava a medida.

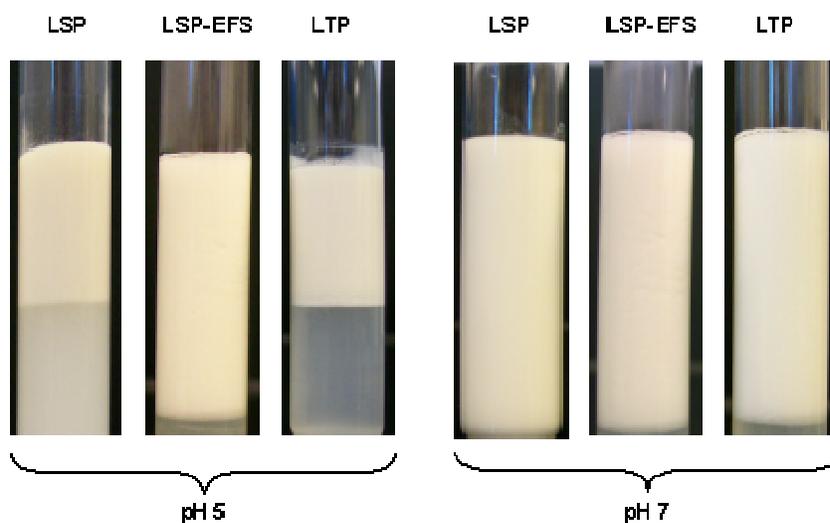


Figura 15. Emulsões (20% óleo, 1% proteína) após 6 horas em repouso a temperatura ambiente.

O pH afetou significativamente a estabilidade das emulsões de todos os tipos de leite em pó avaliados. Entretanto, as emulsões de LSP-EFS foram afetadas em menor intensidade. As emulsões em pH 7 apresentaram cinéticas de cremeamento similares (Figura 16), sendo que todas mostraram boa estabilidade nesse pH. Ao final do teste nesse pH, as emulsões com LTP apresentaram menor estabilidade (índice de cremeamento de 3,0%) em relação às emulsões com LSP (0,2%) e com LSP-EFS (0,4%), as quais não diferiram entre si.

Tabela 13. Índice de cremeamento (%), após 6 horas de repouso a temperatura ambiente, de emulsões (20% óleo, 1% proteína) preparadas em pH 5 e 7.

Índice de cremeamento (%) ¹	LSP	EFS-LSP	LTP
pH 7	0,2 ± 0,3 ^{bB}	0,4 ± 0,6 ^{bB}	3,0 ± 0,1 ^{aB}
pH 5	37 ± 4 ^{aA}	7 ± 3 ^{bA}	38,49 ± 0,01 ^{aA}

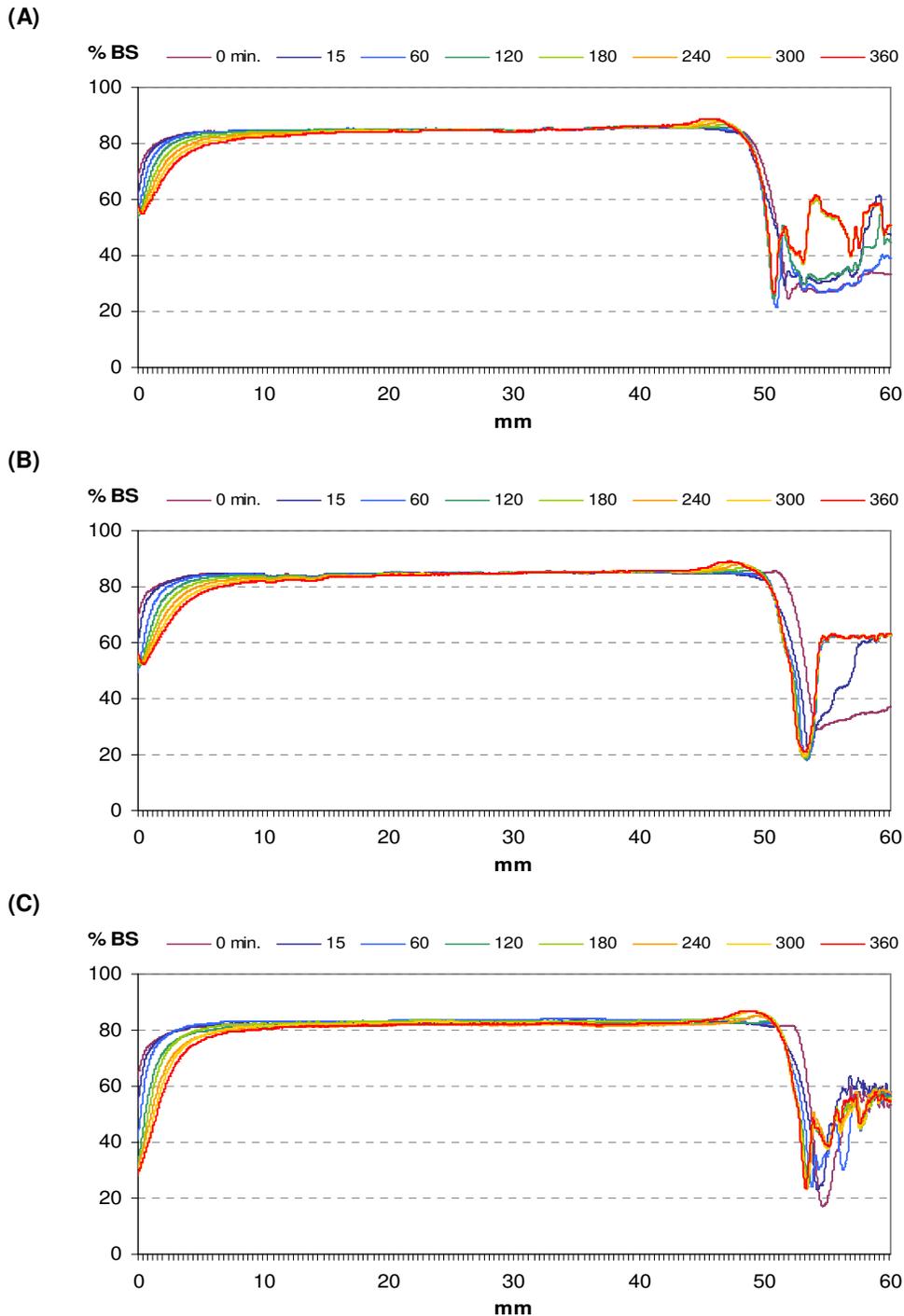
^{ab} Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

^{AB} Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

¹ Médias e desvios-padrão, entre parênteses, de três ensaios ($n=3$)

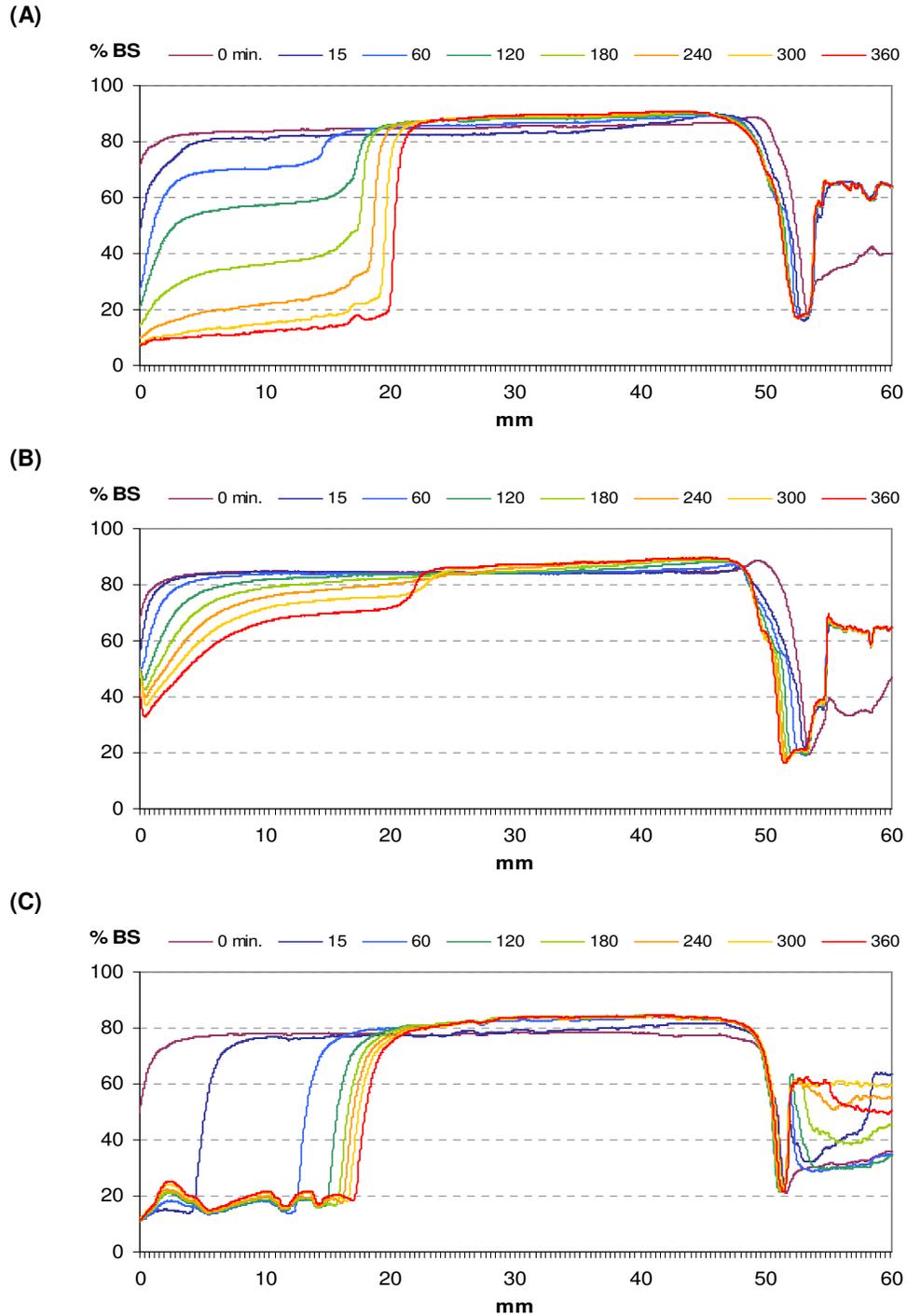
As emulsões em pH 5 apresentaram estabilidade bem inferior às mesmas emulsões em pH 7 (Figura 17). Nesse pH reduzido, as emulsões de LSP-EFS se mostraram mais estáveis do que as demais, chegando ao final do teste com um índice de cremeamento inferior (7%) em relação às emulsões com LSP (37%) e com LTP (38,49%). A melhor capacidade emulsificante do leiteiro de soro em pó submetido à extração supercrítica pode ser explicada principalmente pelo seu menor teor de lipídeos, resultando em uma proporção maior de proteína em relação aos lipídeos na emulsão, e maior teor de fosfolipídeos, que por sua natureza anfótera são considerados bons emulsificantes. Além disso, proteínas globulares, como as soro-proteínas encontradas no leiteiro de soro em pó, se tornam bons emulsificantes somente quando têm sua estrutura parcialmente aberta (Sikorski, 2007), em função da exposição a aquecimento leve e prolongado (Ju e Kilara, 1998), como as condições utilizadas nesse trabalho durante a extração supercrítica.

A indústria fabricante de leiteiros em pó recomenda seu uso como ingrediente especialmente em produtos de panificação, iogurtes, sorvetes, leites recombinaados e chocolate (Dairy Crest, Inglaterra; Dairy Powders, Tailândia; Grain Millers, Estados Unidos; Kerry, Irlanda), devido seus efeitos benéficos sobre cor, sabor, emulsificação e capacidade de retenção de água desses produtos (Dairy Management Inc, 2005). Os leiteiros de soro em pó obtidos nesse trabalho apresentaram características de composição e propriedades funcionais que possibilitariam seu uso de maneira semelhante ao leiteiro tradicional em pó, porém com algumas vantagens. Os leiteiros em soro em pó (LSP e LSP-EFS) apresentaram elevado teor de fosfolipídeos e mantiveram alta solubilidade mesmo em pH 5 e o LSP-EFS mostrou menor perda da capacidade estabilizante de emulsões quando o pH foi reduzido de 7 para 5, o que possibilitaria seu uso em alimentos de pH ácido como maionese, alguns tipos de sopa e molhos para saladas ou pratos prontos.



%BS: percentual de *back scattering* (retro-difusão da luz)

Figura 16. Cinética de cremeamento de emulsões (20% óleo, 1% proteína, pH 7) em repouso por 6 horas a temperatura ambiente: (A) LSP, (B) LSP-EFS, (C) LTP.



%BS: percentual de *back scattering* (retro-difusão da luz)

Figura 17. Cinética de cremeamento de emulsões (20% óleo, 1% proteína, pH 5) em repouso por 6 horas a temperatura ambiente: (A) LSP, (B) LSP-EFS, (C) LTP.

6 CONCLUSÕES

A aplicação associada dos processos de filtração em membrana (ultrafiltração e diafiltração) e de extração com fluido supercrítico ao leite de soro promoveu a remoção de grande parte de seus minerais, lactose e lipídeos apolares, permitindo a obtenção de um ingrediente lácteo enriquecido em componentes derivados da membrana do glóbulo de gordura do leite, especialmente fosfolipídeos.

Os dois ingredientes obtidos nesse trabalho a partir do leite de soro podem ser considerados produtos com características interessantes para o uso em alimentos. Ambos apresentaram baixo residual de caseínas, lactose e minerais, o leite de soro em pó apresentou uma proporção média lipídeo:proteína de 1:1 e alta concentração de fosfolipídeos (~7%), e o pó tratado com EFS apresentou menor teor de lipídeos apolares e uma proporção maior de fosfolipídeos (total ~12%), sendo que a relação FL:lipídeo passou de 1:6,6 para 1:1,7 com a extração supercrítica.

As propriedades funcionais (solubilidade protéica e capacidade emulsificante) dos leites de soro em pó obtidos, tratados ou não com EFS, foram pouco ou não afetadas pelo pH, enquanto o abaixamento de pH prejudicou as características da amostra comercial de leite tradicional em pó, devido ao alto teor de caseínas nesse tipo de pó em relação aos de leites de soro. Além disso, a extração supercrítica melhorou a estabilidade da emulsão produzida a partir do leite de soro em pó em pH 5.

Assim, os leites de soro em pó obtidos podem ser considerados ingredientes com grande possibilidade de uso na indústria de alimentos, como fonte de lipídeos e proteínas de qualidade, associando propriedades tecnológicas, especialmente para uso em alimentos de baixo pH, e conteúdo de compostos potencialmente benéficos à saúde, principalmente após o tratamento com a extração supercrítica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, J.M.A.; NICOLINO, A.P.N.; BLATT, C. Utilização do dióxido de carbono supercrítico na concentração de tocoferóis do destilado desodorizado do óleo de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.1, p.201-205, 2000.

ARAÚJO, M.E.; MACHADO, N.T.; FRANÇA, L.F.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical extraction of pupunha (*Guiljelma speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n.3, p.297-306, 2000.

ARUL, J.; TARDIF, I.; ARMAND, B.; MCGINNIS, D.S.; LENCKI, R W. Solubility of milk fat triglycerides in supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, v.27, p.459-467, 1994.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th Ed. Washington, 2003. v.1-2.

ASTAIRE, J. C. *Microfiltration and supercritical fluid extraction of buttermilk to concentrate biological lipid messengers*. 2002. Tese (Mestrado em Science in Agriculture, Dairy Products Technology) - California Polytechnic State University, Faculty of the Agricultural Sciences Department, Estados Unidos.

ASTAIRE, J. C., WARD, R.; GERMAN, J.B.; JIMENEZ-FLORES, R. Concentration of polar MFGM lipids from buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2297–2307, 2003.

BATRAKOV, S. G.; MOSEZHNYI, A.E.; RUZHITSKY, A.O.; SHEICHENKO, V.I.; NIKITIN, D.I. The polar-lipid composition of the sphingolipid-producing bacterium *Flectobacillus major*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1484, p.225–240, 2000.

BAUMAN, D.E.; MATHER, I.H.; WALL, R.J.; LOCK, A.L. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1235–1243, 2006.

BECART, J. ; CHEVALIER, C. ; BIESSE, J. Quantitative analysis of phospholipids by HPLC with a light scattering evaporating detector - application to raw materials for cosmetic use. *Journal of High Resolution Chromatography*, v.13, p.126–129, 1990.

BRITTEN, M.; LAMOTHE, S.; ROBITAILLE, G. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *International Journal of Food Science and Technology*, v.43, p.651-657, 2008.

CHERYAN, M. *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Urbana Illinois, USA: Technomic Publishing Co. Inc. 1998.

COELHO, L.A.F; OLIVEIRA, J.V.; PINTO, J.C. Modelagem e simulação do processo de extração supercrítica do óleo essencial de alecrim. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n.4, p.446-448, 1997.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. Characterization of the interface of an oil-in-water emulsion stabilized by milk fat globule membrane material. *Journal of Dairy Research*, v.65, p.465–477, 1998.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D.G. Isolates from industrial buttermilk: emulsifying properties of material derived from the milk fat globules membrane. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.45, p.4595-4600, 1997.

CORREDIG, M.; ROESCH, R.R.; DALGLEISH, D.G. Production of a novel ingredient from buttermilk. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.9, p.2744-2750, 2003.

COUVREUR, S.; HURTAUD, C. ; MARNET, P.G. ; FAVERDIN, P. ; PEYRAUD, J.L. Composition of milk fat from cows selected for milk fat globule size and offered either fresh pasture or a corn silage-based diet. *Journal of Dairy Science*, v.90, 392–403, 2007.

DE NONI, I.; RESMINI, P. Identification of rennet-whey solids in “traditional butter” by means of HPLC/ESI-MS of non-glycosylated caseinomacropeptide A. *Food Chemistry*, v.93, p.65–72, 2005.

DEWETTINCK, K.; ROMBAUT, R.; THIENPONT, N.; LE, T.T.; MESSENS, K.; VAN CAMP, J. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, v.18, n.5, p.436-457, 2008.

ENOMOTO, A.; NAKAMURA, K.; HAKODA, M.; AMAYA, N. Lethal effect of high-pressure carbon dioxide on a bacterial spore. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.83, n.3, p.305-307, 1997.

EVERS, J.M. The milkfat globule membrane - compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal*, v.14, n.8, p.661-674, 2004.

FONG, B.Y.; NORRIS, C.S.; MACGIBBON, A.K.H. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*, v.17, n.4, p.275-288, 2007.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic and Professional, 1998.

GÖBEL, R.; FRANZKE, C. Phosphatide als Emulgatoren für die lebensmittelindustrie, literature- und patentbericht. *Lebensmittelindustrie*, v.25, p.497-499, 1978.

GRAVES, E.L.F.; BEAULIEU, A.D.; DRACKLEY, J.K. Factors affecting the concentration of sphingomyelin in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.706-715, 2007.

HAUG, A.; HØSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, v.6, p.25-40, 2007.

HAUTHAL, W.H. Advances with supercritical fluids. *Chemosphere*, v.43, p.123-135, 2001.

HIERRO, M.T.G.; RUIZ-SALA, P.; ALONSO, L.; SANTA-MARIA, G. Extraction of ewe's milk cream with supercritical carbon dioxide. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, v.200, p.297-300, 1995.

HUANG, Z.; KAWI, S.; CHIEW, Y.C. Solubility of cholesterol and its esters in supercritical carbon dioxide with and without co-solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, v.30, p.25-39, 2004.

HUWILER, A., KOLTER, T.; PFEILSCHIFTER, J.; SANDHOFF, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1485, p.63–99, 2000.

JENSEN, R.G. Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, v.85, n. 2, p.295-350, 2002.

JIMÉNEZ-FLORES, R.; YE, A.; SINGH, H. Interactions of whey proteins during heat treatment of oil-in-water emulsions formed with whey protein isolate and hydroxylated lecithin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.10, p.4213-4219, 2005.

JU, Z.Y.; KILARA, A. Aggregation induced by calcium chloride and subsequent thermal gelation of whey protein isolate. *Journal of Dairy Science*, v.81, p.925-931, 1998.

KANNO, C. Secretory membranes of the lactating mammary gland. *Protoplasma*, v.159, p.184–208, 1990.

KANNO, C.; KIM, D.-H. A simple procedure for the preparation of bovine milk fat globule membrane and a comparison of its composition enzymatic activities, and electrophoretic properties with those prepared by other methods. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.54, n.11, p.2845–2854, 1990

KILARA, A.; PANYAM, D. Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.43, p.607–633, 2003.

KISEL, M.A.; KULIK, L.N.; TSYBOVSKY, I.S.; VLASOV, A.P.; VOROB'YOV, M.S.; KHOLODOVA, E.A.; ZABAROVSKAYA, Z.V. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *International Journal of Pharmaceutics*, v.216, p.105–114, 2001.

- KSIBI, H. The solvent-solute interaction in supercritical solution at equilibrium: modeling and related industrial applications. *International Journal of Thermodynamics*, v.7, n.3, p.131-140, 2004.
- LAMEIRA, C.P.; COELHO, G.L.V.; MOTHÉ, C.G. Extração de lipídeos da amêndoa de castanha de caju com CO₂ supercrítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n.4, p.405-407, 1997.
- LASCELLES, A.K. Role of the mammary gland and milk in immunology. In M. PEAKER (Ed.). *Comparative Aspects of Lactation*. London: Academic Press, p.241-260. 1977.
- LINDEN, G.; LORIENT, D. *New Ingredients in Food Processing - Biochemistry and Agriculture*. Boca Raton: CRC Press. 1999.
- LINZELL, J.L. Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursors of milk. In B.L. LARSON e V.R. SMITH (Eds.), *Lactation, a Comprehensive Treatise*. New York: Academic Press, v.I, p.143-225. 1974.
- LINZELL, J.L. Milk yield, energy loss in milk, and mammary gland weight in different species. *Dairy Science Abstracts*, v.34, p.351-360, 1972.
- LINZELL, J.L.; PEAKER, M. Mechanism of milk secretion. *Physiological Reviews*, v.51, p.564-597, 1971.
- LUCAS, S.; COCERO, M. J. Improvement of soluble coffee aroma using an integrated process of supercritical CO₂ extraction with selective removal of the pungent volatiles by adsorption on activated carbon. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.23, n.2, p.197-203, 2006.
- MATHER, I.H. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.203-247, 2000.
- MATHER, I.H.; KEENAN, T.W. The cell biology of milk secretion: historical notes *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.3, n.3, p.227-232, 1998.

McCRAE, C.H. Heat stability of milk emulsions: phospholipids-protein interactions. *International Dairy Journal*, v.9, p.227-231, 1999.

McPHERSON, A.V.; DASH, M.C.; KITCHEN, B.J. Isolation and composition of milk fat globule membrane material. I - from pasteurized milks and creams. *Journal of Dairy Research*, 51, 279–287, 1984.

MENDES, M.; OLIVEIRA, J.V.; ULLER, A. Fracionamento de óleos de citros utilizando fluidos supercríticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n.4, p.441-445, 1997.

MISTRY, V.V.; MAUBOIS, J.L. Application of membrane separation technology to cheese production. In P.F. Fox, *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, v.1. London: Elsevier Applied Science. 1993.

MORIN, P.; BRITTEN, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; POULIOT, Y. Microfiltration of buttermilk and washed cream buttermilk for concentration of milk fat globule membrane components. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.5, p.2132-2140, 2007a.

MORIN, P.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; POULIOT, Y. Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, v.17, p.1179–1187, 2007b.

MORIN, P.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; POULIOT, Y. Effect of temperature and pore size on the fractionation of fresh and reconstituted buttermilk by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, v.87, n.2, p.267-273, 2004.

MORIN, P.; POULIOT, Y.; JIMÉNEZ-FLORES, R. A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration. *Journal of Food Engineering*, v.77, n.3, p.521-528, 2006.

NOBREGA, L.P.; MONTEIRO, A.R.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M.A.O.M. Comparison of ginger (*Zingiber officiale roscoe*) oleoresin obtained with ethanol and isopropanol with that obtained with pressurized CO₂. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n.4, p.408-412, 1997.

NOH, S.K.; KOO, S.L. Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *Journal of Nutrition*, v.134, p.2611–2616, 2004.

OGG, S. L.; WELDON, A.L.; DOBBIE, L.; SMITH, A.J.H.; MATHER, I.H. Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.101, p.10084–10089, 2004.

PATTON, S.; FOWKES, F.M. The role of the plasma membrane in the secretion of milk fat. *Journal of Theoretical Biology*, v.15, p.274-281, 1967.

RICCIO, P. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends in Food Science and Technology*, v.15, n.9, p.458-461, 2004.

ROESCH, R. R.; RINCON, A.; CORREDIG, M. Emulsifying properties of fractions prepared from commercial buttermilk by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.4080–4087, 2004.

ROMBAUT, R.; CAMP, J.V.; DEWETTINCK, K. Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *International Journal of Food Science and Technology*, v.41, n.4, p.435-443, 2006.

ROMBAUT, R.; DEJONCKHEERE, V.; DEWETTINCK, K. Filtration of milk fat globule membrane fragments from acid buttermilk cheese whey. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.4, p.1662-1673, 2007.

SAACKE, R.G.; HEALD, C.W. Cytological aspects of milk formation and secretion. In B.L. LARSON e V.R. SMITH (Eds.), *Lactation, a Comprehensive Treatise*. New York: Academic Press, v.II, p.147-189. 1974.

SACHDEVA, S.; BUCHHEIM, W. Recovery of phospholipids from buttermilk using membrane processing. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, v.49, n.1, p.47-68, 1997

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; MAZZAFERA, P. Supercritical carbon dioxide extraction of methylxanthines from mate tea leaves. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n.3, p.251-260, 2000.

SARMENTO, L.A.V.; MACHADO, R.A.F.; BOLZAN, A.; SPRICIGO, C.B.; PETRUS, J.C.C. Use of reverse osmosis membranes for the separation of lemongrass essential oil and supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.21, n.2, p.285-291, 2004.

SIKORSKI, Z.E. *Chemical and Functional Properties of Food Components*. 3rd Ed. Boca Raton: CRC Press. 2007.

SILVA, C.F.; MENDES, M.F.; PESSOA, F.L.P; QUEIROZ, E.M. Supercritical carbon dioxide extraction of macadamia (*Macadamia integrifolia*) nut oil: experiments and modeling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.25, n.1, p.175-181, 2008.

SINGH, H.; TOKLEY, R.P. Effects of preheat treatments and buttermilk addition on the seasonal variations in the heat stability of recombined evaporated milk and reconstituted concentrated milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.45, p.10-16, 1990.

SMIT, G (Ed.). *Dairy Processing: Improving Quality*. Boca Raton: CRC Press e Cambridge: Woodhead Publishing, 2003.

SODINI, I.; MORIN, P.; OLABI, A.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. *Journal of Dairy Science*, v.89, n.2, p.525-536, 2006.

SPILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A.. Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids*, v.22, p.55-63, 2002.

SPITSBERG, V.L. Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, v.88, n.7, p.2289-2294, 2005.

SPITSBERG, V.L.; GOREWIT, R.C. In vitro phosphorylated bovine milk fat globule membrane proteins. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.8, n.4, p.181-189, 1997.

STATSOFT, INC. *STATISTICA for Windows* [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

STEIN, O.; STEIN, Y. Lipid synthesis, intracellular transport and secretion. II. Electron microscopic radioautographic study of the mouse lactating mammary gland. *The Journal of Cell Biology*, v.34, p.251-263, 1967.

SURH, J.; WARD, L.S.; MCCLEMENTS, D.J. Ability of conventional and nutritionally-modified whey protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions. *Food Research International*, v.39, n.7, p.761-771, 2006.

SZUHAJ, B. F. Lecithin production and utilization. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.60, p.306–309, 1983.

TETRA PAK. *Dairy Processing Handbook*. Lund, Suécia: Tetra Pak Processing Systems AB. 2003.

THOMPSON, A.K.; SINGH, H. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.410–419, 2006.

TURCOT, S.; TURGEON, S.L.; St.GELAIS, D. Effect of buttermilk phospholipids concentrations in cheese milk on production and composition of low fat Cheddar cheese. *Lait*, v.81, p.429-442, 2001.

TURNER, C.; KING, J.W.; MATHIASSEN, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography A*, v.936, p.215-237, 2001.

VANHOUTTE, B.; ROMBAUT, R.; DEWETTINCK, K.; VAN DER MEEREN, P. Phospholipids. In L.M.L. NOLLET (Ed.), *Food analysis*, New York, USA: Marcel Dekker. 2004, p.349–382.

VANNIEUWENHUYZEN, W. Lecithin production and properties. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.53, p.425–427, 1976.

- VANNIEUWENHUYZEN, W. The industrial use of special lecithins, a review. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v.58, p.886–888, 1981.
- VORBACH, C.; SCRIVEN, A.; CAPECCHI, M.R. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: Gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes & Development*, v.16, p.3223–3235, 2002.
- WAGNER, J. *Membrane Filtration Handbook - Practical Tips and Hints*. 2nd Ed., Minnesota: Osmonics, Inc. 2001.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. *Dairy Science and Technology*. 2nd Edition, Boca Raton: CRC Press. 2006.
- WANG, X.; HIRMO, S.; MILLEN, R.; WADSTROM, T. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.20, p.275–281, 2001.
- WIKING, L.; NIELSEN, J.H.; BAVIUS, A.-K.; EDVARDSSON, A.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1004–1009, 2006.
- WONG, P.Y.Y.; KITTS, D.D. A comparison of the buttermilk solids functional properties to nonfat dried milk, soy protein isolate, dried egg white, and egg yolk powders. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.3, p.746-754, 2003.
- YE, A.; ANEMA, S.G.; SINGH, H. Behaviour of homogenized fat globules during the spray drying of whole milk. *International Dairy Journal*, v.17, p.374–382, 2007.
- ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, v.23, n.5, p.399-405, 2004.