

## Uma revisão sobre o efeito do hexametáfosfato de sódio na estrutura das micelas de caseína

A review on the effect of sodium hexametaphosphate on the structure of casein micelles

Una revisión sobre el efecto del hexametáfosfato de sódio en la estructura de las micelas de caseína

Recebido: 01/02/2022 | Revisado: 06/02/2022 | Aceito: 16/02/2022 | Publicado: 22/02/2022

**Isabela Carolina de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5691-0212>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [isabelacarolina15@hotmail.com](mailto:isabelacarolina15@hotmail.com)

**Caroline Barroso dos Anjos Pinto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5914-5007>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [caroline-barroso@hotmail.com](mailto:caroline-barroso@hotmail.com)

**Nathalia da Silva Campos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3983-8735>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [nathalia.campos@hotmail.com](mailto:nathalia.campos@hotmail.com)

**Alan Frederick Wolfschoon Pombo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8198-7059>  
Inovaleite – Grupo de Pesquisa Multicêntrico, Alemanha  
E-mail: [awolfschoon@googlemail.com](mailto:awolfschoon@googlemail.com)

**Alfredo Walter**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3804-8491>  
ICL Group South America, Brasil  
E-mail: [alfredo.walter@icl-group.com](mailto:alfredo.walter@icl-group.com)

**Ítalo Tuler Perrone**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3393-4876>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [italotulerperrone@gmail.com](mailto:italotulerperrone@gmail.com)

**Rodrigo Stephani**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0237-8325>  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil  
E-mail: [rodrigostephani@gmail.com](mailto:rodrigostephani@gmail.com)

### Resumo

O hexametáfosfato de sódio, da sigla em inglês, SHMP, é comumente utilizado para controlar a acidez, estabilizar e retardar a gelatinização de produtos lácteos e na fusão de queijos na fabricação de queijos fundidos. Este sal dissocia as micelas de caseína presentes no leite, sequestrando íons de cálcio. Em estudos anteriores, o SHMP, se mostrou o mais eficiente em dissociar as micelas de caseína, em comparação a outros sequestrantes de cálcio. Variações na temperatura e no pH, afetam o equilíbrio mineral-proteína e interações eletrostáticas, levando a desestruturação das micelas de caseína. Visto que a turbidez de uma suspensão coloidal, como o das micelas de caseína no leite, está relacionada ao tamanho e as propriedades de espalhamento das partículas dispersas, espera-se que as dissociações das micelas de caseína reduzam a turbidez do leite. Esta revisão descreve as estratégias recentemente desenvolvidas para superar desafios relacionados a turbidez do leite, utilizando SHMP, mas não apresenta sua utilização na indústria queijeira (fundidos). A otimização das melhores condições de pH, temperatura e concentração de SHMP, podem trazer uma nova metodologia para o desenvolvimento de bebidas translúcidas e superar problemas de solubilidade de leites concentrados com alto teor proteico.

**Palavras-chave:** Hexametáfosfato de sódio; Turbidez do leite; Dissociação de micelas de caseína.

### Abstract

Sodium hexametaphosphate (SHMP) is commonly used to control acidity, stabilize and retard gelatinization of dairy products and in the melting of cheeses in the manufacture of processed cheeses. This salt dissociates the casein micelles present in milk, sequestering calcium ions. In previous studies, SHMP was shown to be the most efficient in dissociating casein micelles compared to other calcium scavengers. Variations in temperature and pH affect the mineral-protein balance and electrostatic interactions, leading to the disruption of casein micelles. Since the turbidity of a colloidal suspension, such as that of casein micelles in milk, is related to the size and spreading properties of the dispersed particles, dissociations of casein micelles are expected to reduce the turbidity of milk. This review describes recently developed strategies to overcome challenges related to milk turbidity using SHMP, but does not present their

use in the cheese industry (melters). Optimization of the best conditions of pH, temperature and concentration of SHMP, can bring a new methodology for the development of translucent beverages and overcome solubility problems of concentrated milks with high protein content.

**Keywords:** Sodium hexametaphosphate; Milk turbidity; Dissociation of casein micelles.

### Resumen

El hexametáfosfato de sodio (SHMP) se utiliza habitualmente para controlar la acidez, estabilizar y retrasar la gelatinización en los productos lácteos y en el fundido de quesos en la fabricación de quesos procesados. Esta sal disocia las micelas de caseína presentes en la leche, secuestrando los iones de calcio. En estudios anteriores, el SHMP, demostró ser más eficiente en la disociación de las micelas de caseína en comparación con otros secuestradores de calcio. Las variaciones de la temperatura y el pH afectan al equilibrio mineral-proteico y a las interacciones electrostáticas, lo que provoca la ruptura de las micelas de caseína. Dado que la turbidez de una suspensión coloidal, como la de las micelas de caseína en la leche, está relacionada con el tamaño y las propiedades de dispersión de las partículas dispersas, se espera que las disociaciones de las micelas de caseína reduzcan la turbidez de la leche. Esta revisión describe las estrategias desarrolladas recientemente para superar los retos relacionados con la turbidez de la leche mediante el uso de SHMP, pero no presenta su uso en la industria del queso (fundidores). La optimización de las mejores condiciones de pH, temperatura y concentración de SHMP, puede aportar una nueva metodología para el desarrollo de bebidas translúcidas y superar los problemas de solubilidad de las leches concentradas con alto contenido en proteínas.

**Palabras clave:** Hexametáfosfato de sódio; Turbidez de la leche; Disociación de las micelas de caseína.

## 1. Introdução

As caseínas representam cerca de 80% das proteínas totais presentes no leite cru. Estas caseínas formam uma suspensão coloidal, denominada de micelas de caseína. Ao longo dos anos, o interesse da indústria alimentícia pelas micelas de caseína aumentou significativamente a fabricação de queijos, iogurtes e os processos de esterilização como a pasteurização e UHT (Ultra-High Temperature) só são possíveis devido a estrutura de micela que as caseínas se organizam (Glantz *et al.*, 2010; de Kruif *et al.*, 2012).

Sais sequestrantes de cálcio como citratos, fosfatos e hexametáfosfatos são utilizados para melhorar a estabilidade térmica, melhorar textura de queijos e iogurtes, retardar o envelhecimento de gelificação em produtos lácteos, entre outras funções. O hexametáfosfato de sódio (SHMP) é um exemplo de sal sequestrante de cálcio muito eficiente frente a outros sais monofosfatos ou citratos. Este sal possui potencial para se ligar até três átomos de cálcio pois suas seis moléculas de fosfato distribuídas homogeneamente permitem que este sal interaja diretamente com resíduos de aminoácido da caseína por interações eletrostáticas. O SHMP provoca repulsões eletrostáticas nas micelas e assim ocorre dissociações da k-caseína (De Kort *et al.*, 2011; Anema, 2015).

Primeiramente, os sais sequestram o cálcio da fase aquosa, o que muda o ambiente eletrostático, e também induzem a liberação de cálcio do interior (dos chamados “nanoclusters”) das micelas, mudando assim o equilíbrio salino (Power *et al.*, 2020). Isso é utilizado por exemplo, na indústria de queijos fundidos para solubilizar o caseinato de cálcio e permitir a sua fusão, hidratação e emulsificação da gordura presente. Os efeitos dos sais fundentes (também chamados de emulsificantes) são dependentes da concentração, pH e temperatura adotados.

Outra abordagem importante para manipular as propriedades das micelas de caseína são as modificações no pH, temperatura, pressão e concentração do leite. Tais manipulações modificam a extensão das interações eletrostáticas, hidrofóbicas e covalentes das micelas provocando a dissociação da k-caseína. Essa dissociação induz diversas mudanças físicas uma vez, que várias propriedades funcionais de lácteos como solubilidade, estabilidade ao calor e as propriedades emulsificantes estão relacionadas ao tamanho das partículas de caseína (Ramchandran *et al.*, 2017).

A compreensão das condições que causam a maior dissociação nas micelas de caseína pode melhorar e ampliar a utilização de diversos produtos lácteos (Ronadheera *et al.*, 2019). Dissociar micelas de caseína pelas alterações no pH, temperatura e adição de hexametáfosfato de sódio, são métodos bem conhecidos para reduzir a turbidez do leite, mas ainda há

muito a ser estudado sobre as propriedades físico-químicas e funcionais do leite quando submetido a diferentes condições de concentração do sal sequestrante de cálcio, pH e temperatura.

## 2. Metodologia

Para o desenvolvimento deste artigo de revisão, inicialmente foram definidos os tópicos de estudo os quais seriam relevantes para se alcançar o objetivo do manuscrito que é fornecer a compreensão sobre as propriedades funcionais do leite devido as associações e dissociações das micelas de caseína provocadas pela adição de hexametáfosfato de sódio, bem como as alterações no pH e temperatura.

Dessa forma, foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas principais bases de dados visando uma revisão sobre as estratégias recentemente desenvolvidas para superar os desafios relacionados a turbidez, solubilidade de concentrados proteicos de leite e estabilidade do leite longa vida (UHT). Após a pesquisa, as informações foram organizadas de acordo com uma sequência que construísse uma narrativa lógica e coerente que levasse ao entendimento do tema central.

## 3. Micelas de Caseína

As micelas de caseína presentes no leite são essenciais para o desenvolvimento de recém-nascidos pois elas são o veículo transportador de fosfato e cálcio necessários para crescimento ósseo de neonatos (de Kruif, 2014). As micelas de caseína, resultam das associações de caseínas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) junto com 7-8% em massa seca de fosfato de cálcio e água (cerca de 3-4 g por caseína). Suas propriedades chaperonas previnem a formação de fibrilas amiloides, enquanto a  $\beta$ - e  $\alpha$ - caseína protegem a  $\kappa$ -caseína da auto agregação para formar fibrilas, elas próprias são protegidas pela  $\kappa$ -caseína da indução de precipitação por íons de cálcio, sendo uma estrutura ideal para levar quantidade necessária de fosfato e cálcio a recém-nascidos (Holt *et al.*, 2013; Bouchoux *et al.*, 2015; Ingham *et al.*, 2016; de Kruif, 2014).

Através de microscopia atômica, microscopia eletrônica de varredura e técnicas de espalhamento de luz, foi possível obter uma visão detalhada da superfície da micela (esférica e rugosa) e do seu tamanho hidrodinâmico médio (cerca de 150-200 nm). A  $\kappa$ -caseína se concentra principalmente na superfície micelar, ela impede que a micela forme uma rede de agregados, pois parte do macro peptídeo (resíduo 106-169) da proteína, parece se estender na superfície micelar formando uma camada pilosa, estimulada de 5-10 nm de espessura, de tal modo que não permitem a aproximação de uma micela da outra por impedimento estérico. Além do impedimento estérico, a agregação é evitada por repulsões eletrostáticas, resíduos de aspartil e glutamyl e moléculas de ácido neuramínico presentes na  $\kappa$ -caseína que estão ionizados no pH natural do leite e geram uma carga de -20mV (Dagleish *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019).

Muito se sabe sobre as micelas de caseína: o seu tamanho médio e da polidispersão, do conteúdo de proteínas, minerais e água presente. Mas ainda há dúvidas sobre a distribuição interna da matéria da micela. A estrutura interna das micelas de caseína é composta por vários elementos que estão em equilíbrio complexo em seu ambiente e as interações intra e intermoleculares das moléculas podem variar de acordo com esse ambiente. O processo de montagem que leva na célula em lactação não pode ser totalmente reproduzido *in vitro*. Estes fatos tornam a micela um objeto dinâmico e complexo que não é fácil de identificar no seu estado nativo (de Kruif, 2014; Bouchoux *et al.*, 2015). Os primeiros estudos de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) deram créditos ao primeiro modelo das micelas, da década de 60, e até hoje há controvérsias do modelo real das micelas de caseína.

Entretanto, trabalhos realizados pelo grupo do Professor Harte em Pennsylvania (Trejo *et al.*, 2011) mostram claramente que a micela tem canais no seu interior, o que evidencia a quantidade de água que elas possuem, o que permite sua compressão e expulsão de água da mesma, por exemplo na tecnologia de fabricação de queijos, justificando a proposta para o

chamado modelo de esponja da micela (seção 2.3). Essa expulsão é limitada porque existem zonas “duras” e diferentes planos ou níveis internos, resistentes à compressão devido a núcleos de cálcio e fosfato (Nogueira *et al.*, 2021; Bouchoux *et al.*, 2015).

### 3.1 Modelo de submicelas

Neste modelo, foi sugerido que as micelas de caseína eram constituídas de subunidades denominadas de submicelas de tamanho médio de 20 nm. Sendo o núcleo dessas submicelas hidrofóbico e a superfície hidrofílica, as interações hidrofóbicas e o fosfato de cálcio coloidal (FCC) mantém as submicelas unidas. A existência das submicelas foi apoiada pela molécula de caseinato de sódio que possui raio médio de 10 nm e seu subcrescimento quando é adicionado cálcio. (Silva *et al.*, 2019; Dalgleish, 2011; Waugh, 1958). Utilizando a técnica crio-TEM, McMahon & McManus (1998) observaram que se existir submicelas elas devem ser menores que 20 nm, conforme dito anteriormente e menos densa do que assumido, de tal forma que na microscopia essas submicelas aparecem como proteína individual.

### 3.2 Modelo de nanoclusters

Segundo o modelo de nanoclusters, resíduos de fosfoseril das  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ -caseína se ligam e estabilizam pequenos domínios de fosfato de cálcio, denominados de nanoclusters. Este modelo foi sugerido após observarem que fosfopeptídeos de  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseína conseguem estabilizar o fosfato de cálcio em concentrações que eles precipitariam.

Os nanoclusters tem raio de 2-3 nm e são envoltos por aproximadamente 50 cadeias de fosfopeptídeos. Esses nanoclusters são dispersos em uma matriz de proteína homogênea se ligando as caseínas mais fosforiladas. As caudas dos nanoclusters se associam a outras proteínas através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligação de hidrogênio, entre outras interações fracas, levando a auto associação das micelas. Dado que a  $\kappa$ -caseína possui poucos centros fosforilados, ela não pode participar da formação de nanoclusters, estando portando disponível para depositar na superfície da micela, sendo um agente terminal das unidades básicas. Se fosse dessa forma, as micelas teriam uma sub-estrutura homogênea ao invés de uma distribuição de fosfato de cálcio dentro das subunidades (Kruif *et al.*, 2012; Dalgleish *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2019).

### 3.3 Modelo esponja

Este modelo esponja foi sugerido ao utilizar técnicas de raio-X a baixo ângulo (SAXS) e o espalhamento de nêutrons a baixo ângulo (SANS). Bouchoux *et al.*, (2010), utilizou essas técnicas em amostras de concentração constante de micelas de caseína e observaram que sua organização interna se compreendia em três principais níveis hierárquicos: (I) o da própria micela de caseína, com dimensão a 100 nm; (II) um nível no interior da micela, que pode ser comprimido de 40 a 10 nm; (III) os núcleos de FCC, de 4 a 5 nm, distribuídos no interior da micela.

Ingham *et al.*, (2016) propôs uma nova interpretação do modelo matemático usado para ajustar os dados de espalhamento de luz. Ele relatou as três regiões hierárquicas, como descrita por Bouchoux *et al.*, (2010), mas observou uma nova região (IV) de imogeneidades de proteína de aproximadamente 2 nm, como já havia sido hipotetizada por Kruif (2014). Essas imogeneidades podem corresponder a aglomerados formados por interações hidrofóbicas de caseína localmente mais densas e também pode ter contribuição de uma coroa proteica das proteínas de fósforo adsorvido aos nanoclusters.

## 4. Modificações nas Estruturas das Micelas de Caseína

A temperatura é um fator importante nas modificações da estrutura das micelas de caseína. A resistência do leite à coagulação durante o aquecimento é chamada de estabilidade ao calor. Apesar do leite apresentar uma certa estabilidade ao calor, o aquecimento por vários minutos acima de 120 °C modifica a estrutura e composição do fosfato de cálcio micelar original para uma forma mais insolúvel e estas mudanças tornam-se parcialmente irreversíveis (Sinaga *et al.*, 2016). Outras

mudanças irreversíveis que ocorrem durante o aquecimento são a hidrólise de resíduos de fosfoserina, degradação da lactose e liberação de k- caseína da micela. A coagulação se torna visível quando grandes agregados são produzidos ou quando um gel é formado (Hart, 2013).

O pH é um outro fator importante, ele afeta a estrutura micelar modificando as cargas de proteína (ou seja, a repulsão eletrostática entre caseínas), a concentração de íons de cálcio livres na fase sérica e a quantidade de FCC na micela de caseína (de Kort, 2012). Em pH 5,2, parte do cálcio e quase todo fosfato inorgânico presente no FCC é solubilizado. Como o FCC atua como uma “ponte” para conectar as caseínas, a perda do fosfato de cálcio micelar será acompanhada pelo encolhimento das micelas e colapso da camada peluda da k-caseína, o que diminui a repulsão entre as micelas. Sem essa camada peluda da k- caseína, os aglomerados tornam-se mais densos e as  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseína precipitam com íons de cálcio (Sinaga *et al.*, 2017; Culler *et al.*, 2017). Em meio alcalino, há aumento das cargas negativas devido a desprotonação de grupos de aminoácidos (Wolfschoon Pombo *et al.*, 2012), fortalecendo forças repulsivas entre as micelas de caseína. O aumento da carga negativa favorece as ligações de hidrogênio das proteínas com a água, observando em pH 6,8 a 8,5 um maior tamanho de micelas de caseína e uma menor turbidez (Gonzalez-Jordan *et al.*, 2015).

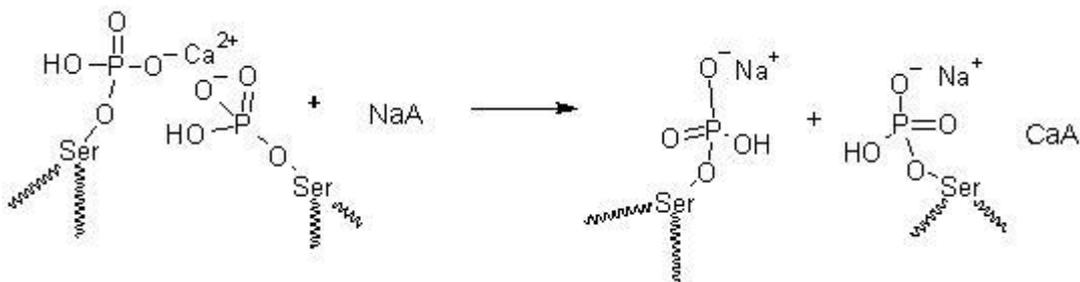
Além da temperatura e pH, as estruturas das micelas de caseína também são afetadas pela adição de sais sequestrantes. O principal impacto da adição de sequestrante é no equilíbrio mineral-proteína, levando a uma diminuição de íons de cálcio livres. A complexação destes sais aos íons de cálcio compromete suas interações eletrostáticas com a k-caseína, podendo ocasionar a dissociação micelar.

#### 4.1 Sais sequestrantes de cálcio

Os sais sequestrantes de cálcio induzem várias mudanças físicas nas micelas de caseína. A ligação do cálcio através da adição de sais sequestrantes, altera sua distribuição entre as fases coloidal e sérica. Em altas concentrações, esses sais sequestrantes trocam os íons de cálcio presente nos nanoclusters por íons de sódio (Figura 1). A troca de íons divalentes por monovalentes leva a abertura da estrutura proteica e exposição de grupos hidrofílicos capazes de ligar a água livre, promovendo hidratação, inchamento, solubilização e dispersão da caseína (Awad, 2002).

Sais sequestrantes de cálcio, como polifosfato de cadeia longa, são essenciais para a fabricação de queijo processado. Além da capacidade de troca iônica, esses sais ajudam na emulsão de sistema multifásico, pois conforme sua concentração, eles conseguem desestruturar as micelas de caseína. Essa capacidade emulsificante pode ser atribuída as atividades na superfície, quanto maior a superfície disponível da caseína melhor será a emulsão (Lazzaro *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Reação química nas micelas de caseína com a adição de altas concentrações de sais sequestrantes de cálcio (NaA); A- Ânion: fosfato, polifosfato, citratos, etc.



Fonte: Adaptado de Fox *et al.* (2004).

Uma vez que o cálcio tem a capacidade de reticular as caseínas, conforme postulado em todos os modelos descritos na literatura, pode ser benéfico remover esse cálcio da micela de caseína, a fim de dissociar pelo menos parcialmente as micelas de caseína, e assim, aprimorar e desenvolver ingredientes lácteos (Xu *et al.*, 2016).

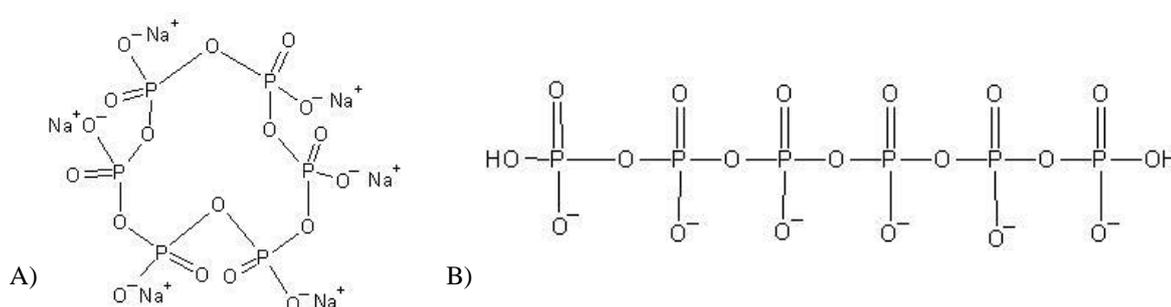
Ao examinar diversos sais sequestrantes de cálcio, o SHMP teve a maior capacidade de dissociar micelas de caseínas. Em baixas concentrações (como 0,1%), formou-se complexos com o cálcio e caseína solúveis. Em concentrações mais altas de SHMP (>0,5%), o cálcio e fosfato ligados a caseína foram liberados do complexo, resultando na dispersão das micelas de caseína (Mizuno & Lucey, 2005).

## 5. Hexametáfosfato de Sódio

O hexametáfosfato de sódio (SHMP) é um sal de polifosfato com cadeia longa (Sais de Graham). Os sais de Graham são obtidos pelo resfriamento rápido de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ou uma mistura dos dois, fundidos entre 600 a 800 °C, com fórmula geral  $\text{Na}_{n+2}\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$ . O grau de polimerização  $n$  (número médio de átomos de fósforo por cadeia) depende das condições de obtenção do sal: tempo, temperatura de aquecimento e pressão (Lima *et al.*, 2010).

O SHMP é um aditivo alimentar registrado como INS n° E452 (i). Sua estrutura consiste principalmente em cadeias lineares, mas uma pequena parte do composto é cíclica (Figura 2) (Gao *et al.*, 2010) e algumas de suas propriedades físico-químicas importantes podem ser vistas na Tabela 1.

**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura do hexametáfosfato de sódio (a) forma cíclica (b) forma linear.



Fonte: Gao *et al.* (2010).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas importantes do hexametáfosfato de sódio.

Parâmetros	Dados
Fórmula	$\text{Na}_{(n+2)}\text{P}_n\text{O}_{(3n+1)} \rightarrow n \sim 13$
Massa molecular (g/mol)	$\cong 1390$
Teor de $\text{P}_2\text{O}_5$ (%)	66,5 – 68,0
Teor de Na (g)	23,4
Fluoretos (ppm)	$\leq 50$
Chumbo (ppm)	$\leq 4$
Arsênio (ppm)	$\leq 3$
pH (em 1 % de solução)	6,7 – 7,2
Substâncias insolúveis (%)	$\leq 0,1$
Densidade aparente ( $\text{kg/m}^3$ )	500-1000

Fonte: ICL, EP-022 - Rev. 07.

O SHMP é frequentemente utilizado em laticínios para melhorar propriedades funcionais de diversos produtos lácteos como controle de acidez, aumento do *shelf-life* de diversos produtos UHT, atraso do mecanismo de gelificação (Anema, 2015), bem como influenciar na estabilidade à coagulação (UHT) de bebidas lácteas adicionadas de hidrocolóides (Pandalaneni *et al.*, 2018).

No leite, o SHMP consegue se ligar simultaneamente ao cálcio na fase sérica e ao cálcio de nanoclusters dentro de micelas de caseína. (de Kort *et al.*, 2011). A sua natureza altamente aniônica, com suas seis cargas distribuídas homogeneamente permitem que o SHMP se oriente ao longo de sítios carregados de outros polieletrólitos de cadeia longa, presentes nas caseínas (de Kort, 2012; Mizuno & Lucey, 2007).

O mecanismo das interações do SHMP e as micelas de caseína ainda não é totalmente compreendido. Mas acredita-se que os íons de cálcio estejam envolvidos nas ligações cruzadas do SHMP, pois quando a solução é submetida a tratamento térmicos há a diminuição da viscosidade, aumento do potencial zeta e atividade de íons de cálcio. Mudanças no ponto isoelétrico mostraram que o SHMP também pode se ligar a caseína mesmo na ausência de cálcio. Em pH neutro, aminoácidos como a arginina, histidina, lisina e grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminal são carregados positivamente. Caseínas (especialmente a  $\alpha_{s2}$ ) são ricas em lisina, podendo então ser o principal ponto de ligações para moléculas de SHMP (de Kort, 2012).

## 6. Estrutura das Micelas de Caseína Durante o Processamento

O comportamento das micelas durante o processamento depende quase inteiramente da estrutura e das propriedades da superfície micelar. Ou seja, diferentes processamentos causam diferentes alterações na estrutura da superfície. Isso pode afetar a estabilidade da micela e conseqüentemente, alterar as características dos produtos lácteos.

### 6.1 Adição de hexametáfosfato de sódio

Culler *et al.* (2017) propôs um modelo a fim de determinar o efeito que diversos sais (citrato, fosfato, polifosfato) tinham sobre a integridade das micelas de caseína, a partir da turbidez das amostras em diferentes valores de pH e concentração de sal (a concentração liminar mínima (C\*) para causar o máximo de dissociação das micelas de caseína). Como relatado anteriormente, o SHMP foi o sal que causou maior dissociação com a menor concentração (C\*=0,33 mM). Essa concentração liminar mínima, não foi afetada pelo pH como a dos outros sais, nos quais as amostras se tornaram mais turvas a medida que o pH diminuiu, o que sugere que o SHMP é capaz de dissociar micelas de caseína mesmo na ausência de cálcio (Culler *et al.*, 2017; Anema, 2015).

As dissociações das micelas de caseína são induzidas conforme a concentração de SHMP é adicionado à solução. De Kort (2012) analisou a variação do tamanho de partícula das micelas de caseína quando a concentração de SHMP variou de 0 a 100 mEq.L<sup>-1</sup>. A concentração limite, na qual partículas menores foram detectadas, foi de 25 mEq.L<sup>-1</sup> de SHMP. O pico de distribuição começou a mudar para partículas com menores diâmetros a partir de 30 mEq.L<sup>-1</sup>, atingindo valores abaixo de 10 nm acima de 50 mEq.L<sup>-1</sup>.

A diminuição da distribuição do tamanho de partícula é acompanhada da redução de espalhamento da luz (turbidez). A turbidez de uma suspensão coloidal está associada ao tamanho e as propriedades de espalhamento das partículas dispersas (Anema, 2015), portanto as agregações e dissociações das micelas de caseínas podem ser examinadas indiretamente pela medida de turbidez. Com aumento do pH e da concentração de SHMP, a atividade do íon de cálcio é reduzida e essa redução é acompanhada pela diminuição da turbidez, conforme a Tabela 2 (de Kort, 2012).

**Tabela 2.** Variação da turbidez conforme variação pH e concentração de SHMP.

Concentração de SHMP (mEq L <sup>-1</sup> *)	pH	Atividade do íon cálcio (mmol)	Turbidez a 700 nm	Viscosidade mPa.s	Potencial Zeta mV
15	6,70	1,13±0,59	2,08±0,35	6,04±1,77	-25,85±2,06
	7,00	0,72±0,07	1,79±0,19	14±4,48	-24,70±0,78
	7,30	0,41±0,07	0,75±0,45	115±34,3	-31,33±1,91
60	6,70	0,30±0,09	0,11±0,01	141±42,3	-33,16±2,8
	7,00	0,21±0,05	0,13±0,01	331,62,9	-37,93±3,39
	7,30	0,14±0,06	0,09±0,03	593±179	-43,00±0,76

Fonte: de Kort *et al.* (2012). \*mEq L<sup>-1</sup> = mmol L<sup>-1</sup> ou mM.

Apesar de ser muito eficiente em dissociar as micelas de caseína, a adição de altas concentrações de SHMP acarreta em um aumento da viscosidade da solução. A quelação do cálcio o desloca para a fase sérica e reduz a proporção de cálcio presente no FCC micelar, gerando assim repulsões eletrostáticas dentro da micela, que juntamente com a perda das ligações cruzadas das proteínas mediadas pelo FCC, geram um inchaço nas micelas, ocasionando dissociações de caseína da micela. De Kort *et al.*, (2011) afirmaram que a dissociação da micela de caseína pode estar diretamente relacionada a um aumento na viscosidade.

Estudos posteriores mostraram que essa viscosidade pode ser reduzida pela enzima transglutaminase (TGase), se a (s) amostra (s) foi (rem) previamente assim tratada (s). Com a adição prévia da TGase, é possível reduzir a viscosidade 3838 mPa s para 991 mPa s para amostras com 25 mM SHMP e 3212 mPa s para 162 mPa s para amostras com 12,5 mM de SHMP. A TGase reticula a proteína de caseína evitando que a k-caseína se dissocie da micela; a reticulação mediada por TGase também pode potencialmente impedir o acesso de SHMP ao FCC dentro da micela de caseína diminuindo, portanto, a viscosidade da solução (Power *et al.*, 2020).

## 6.2 Alteração no pH e na temperatura

As dissociações das micelas de caseína são também marcadamente dependentes da temperatura e do pH. Em temperaturas de 5°C, interações hidrofóbicas intermoleculares são mínimas, parte significativa da β-caseína dissocia-se da estrutura micelar, e mesmo no pH natural do leite (ao redor de 6,7), é notável uma redução da turbidez ( $\square = 15-25$ ). Nesta mesma temperatura, ao reduzir o pH das amostras de leite para 5,5, ocorre a solubilização do FCC, a maioria das interações hidrofóbicas e covalentes que mantinham a estrutura micelar são perdidas com a solubilização do FCC, ocasionando uma turbidez mínima ( $\square = 10-15$ ). Essa turbidez mínima também é observada em pH 7,5; a maior carga negativa nas proteínas leva a uma maior hidratação das micelas de caseína (Orlien *et al.*, 2010).

Ao aquecer amostras de leite desnatado, de 20 °C a 70°C, no pH natural do leite não há mudanças significativas na turbidez, o que sugere que o aquecimento nessa faixa de temperatura não causa ruptura na estrutura básica das micelas. Nessa mesma faixa de temperatura em pH <6,3 é notório um aumento da turbidez da solução, visto que as caseínas apresentam mais agregação com a redução do pH. O aumento do pH, para pH < 6,9, acarreta liberação de uma quantidade significativa de β e α-caseína para o soro e uma maior hidratação das micelas, resultando na diminuição da turbidez nas amostras em toda faixa de temperatura (Anema & Li, 2003; Dalgleish, 2012; Anema, 2015). A turbidez mais baixa de amostras analisadas foi para o pH 7,5 próximos a 60 °C, segundo Anema (2015).

Alterações nas micelas de caseína foram marcadamente afetados pelo pH no aquecimento. A pH em torno de 6,50-6,55, o tamanho da micela da caseína aumentou acentuadamente durante as fases iniciais de aquecimento, e o tamanho do planalto em aquecimento prolongado. O aumento máximo do tamanho foi de 30-35 nm. Em contraste, a pH elevado (6,7),

alterações muito menores em tamanho foram observadas no aquecimento e o aumento máximo no tamanho foi de apenas 10 nm.

A partir de 70 °C, as proteínas do soro do leite  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -lac) e  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) começam a desnaturar, e juntamente com a  $\kappa$ -caseína, formam complexo (s) através de ligações de dissulfetos, com tamanho de partículas variando de 30-10 nm. À medida que o pH é aumentado, a carga de superfície da micela e, em particular, a carga sobre os “fios” de macropeptídios vão aumentar. Isto fará com que os fios se estendam mais longe da superfície da micela e, portanto, pode, através de cargas e possivelmente repulsões estéricas, reduzir a propensão de interações entre as proteínas desnaturadas do soro de leite e a micela de caseína (Anema & Li, 2003).

Com a integridade da micela afetada, as  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -caseína são dissociadas das micelas e precipitadas por íons de cálcio, resultando em um aumento linear da turbidez das amostras (Anema & Klostermeyer, 1997).

## 7. Solubilidade de Leites Concentrados

Os concentrados proteicos de leite, como proteínas do soro do leite, Whey Protein como é comercialmente vendido, vêm sendo procurados com frequência, principalmente por atletas que os utiliza para a manutenção de dietas que necessitam de altos valores diários de proteína.

A dissociação das micelas de caseína em estruturas menores, facilita uma melhor reidratação de pós de leites proteicos concentrados. O ajuste do pH para 6 antes da ultra filtração (UF) do leite destinada à concentração para a fabricação de pó, melhorou a solubilidade do mesmo de 80% para 95% (Eshpari *et al.*, 2014).

McCarthy *et al.* (2017) relataram que a adição de hexametáfosfato de sódio antes da UF, melhorou a solubilidade de 81,4% para 99,5 % após a reidratação, porém a viscosidade da solução aumentou significativamente.

Em leite de búfalo destinado a secagem, o problema com solubilidade é ainda maior do que com o leite bovino, pois o leite bubalino possui maior concentração de cálcio e micelas de caseína. Na fabricação de leite em pó, a adição de trifosfato de sódio e hexametáfosfato de sódio ao leite de búfala antes da secagem do pó (MPC60), por spray drying, melhorou visivelmente a solubilidade do pó resultante, passando de 67 % das amostras do controle a 81 % (Shinde *et al.*, 2021).

## 8. Considerações Finais

A importância e o impacto de uma melhor compreensão das propriedades físico-químicas e funcionais das micelas de caseína com a adição de hexametáfosfato de sódio em diferentes condições de concentração, pH e temperatura foram revisados.

A elucidação dessas propriedades, bem como a otimização das condições que levam a maior dissociação das micelas de caseína, podem levar ao desenvolvimento de um produto proteico translúcido, uma vez que a responsável pela cor branca ou turva no leite são as micelas de caseína.

Um entendimento melhor de como ocorrem as dissociações e associações das micelas de caseína são cruciais para ampliação e inovações de produtos lácteos. Assim, ações simples e inovadoras como a adição de sais sequestrantes de cálcio, bem como alterações no pH e na temperatura no processamento, podem aumentar a solubilidade, estabilidade térmica e outras propriedades funcionais. Essas alterações podem ser adotadas facilmente pelas indústrias sem alterar significativamente suas linhas de produção.

Desenvolvimentos futuros nesta linha de pesquisa incluem o estudo das propriedades físico-químicas e funcionais do leite quando submetido a diferentes condições de concentração do sal sequestrante de cálcio, pH e temperatura, além do desenvolvimento de novas metodologias para bebidas translúcidas e superar problemas de solubilidade de leites concentrados com alto teor proteico.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, DF, Brasil, código financeiro 001), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, DF, Brasil, projetos 400864/2018-5, 307334/2020-1 e 315337/2018-4) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Belo Horizonte, MG, Brasil).

## Referências

- Anema, S. G., & Li, Y. (2003). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of dairy Research*, 70(1), 73-83.
- Anema, S. G. (2015). The effect of hexametaphosphate addition during milk powder manufacture on the properties of reconstituted skim milk. *International Dairy Journal*, 50, 58-65.
- Anema, S. G., & Klostermeyer, H. (1997). Heat-induced, pH-dependent dissociation of casein micelles on heating reconstituted skim milk at temperatures below 100 C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1108-1115.
- Awad, R. A., Abdel-Hamid, L. B., El-Shabrawy, S. A., & Singh, R. K. (2002). Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *LWT-Food Science and Technology*, 35(1), 54-61.
- Bouchoux, A., Ventureira, J., Gésan-Guizou, G., Garnier-Lambrouin, F., Qu, P., Pasquier, C., Pezenec, S., Schweins, R., & Cabane, B. (2015). Structural heterogeneity of milk casein micelles: a SANS contrast variation study. *Soft Matter*, 11(2), 389-399.
- Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft matter*, 7(6), 2265-2272.
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual review of food science and technology*, 3, 449-467.
- Eshpari, H., Tong, P. S., & Corredig, M. (2014). Changes in the physical properties, solubility, and heat stability of milk protein concentrates prepared from partially acidified milk. *Journal of dairy science*, 97(12), 7394-7401.
- ICL, Especificação de Produto: Hexameta Fosfato de Sódio Grau Alimentício - Origem: EUA; EP-022 - Rev. 07.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*. Elsevier.
- Gao, R., van Halsema, F. E. D., Temminghoff, E. J. M., van Leeuwen, H. P., van Valenberg, H. J. F., Eisner, M. D., & van Boekel, M. A. J. S. (2010). Modelling ion composition in simulated milk ultrafiltrate (SMUF) II. Influence of pH, ionic strength and polyphosphates. *Food chemistry*, 122(3), 710-715.
- Glantz, M., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Månsson, H. L., Stålhammar, H., & Paulsson, M. (2010). Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1444-1451.
- Gonzalez-Jordan, A., Thomar, P., Nicolai, T., & Dittmer, J. (2015). The effect of pH on the structure and phosphate mobility of casein micelles in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 51, 88-94.
- Ye, R., & Harte, F. (2013). Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of dairy science*, 96(2), 799-805.
- Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of dairy science*, 96(10), 6127-6146.
- Ingham, B., Smialowska, A., Erlangga, G. D., Matia-Merino, L., Kirby, N. M., Wang, C., & Carr, A. J. (2016). Revisiting the interpretation of casein micelle SAXS data. *Soft Matter*, 12(33), 6937-6953.
- de Kort, E., Minor, M., Snoeren, T., van Hooijdonk, T., & van der Linden, E. (2011). Effect of calcium chelators on physical changes in casein micelles in concentrated micellar casein solutions. *International Dairy Journal*, 21(12), 907-913.
- de Kort, E. J. (2012). *Influence of calcium chelators on concentrated micellar casein solutions: from micellar structure to viscosity and heat stability*.
- de Kruif, C. G. (2014). The structure of casein micelles: A review of small-angle scattering data. *Journal of Applied Crystallography*, 47(5), 1479-1489.
- de Kruif, C. G., & Huppertz, T. (2012). Casein micelles: size distribution in milks from individual cows. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4649-4655.
- Holt, C., De Kruif, C. G., Tuinier, R., & Timmins, P. A. (2003). Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2-3), 275-284.
- Lazzaro, F., Saint-Jalmes, A., Violleau, F., Lopez, C., Gaucher-Delmas, M., Madec, M. N., & Gaucheron, F. (2017). Gradual disaggregation of the casein micelle improves its emulsifying capacity and decreases the stability of dairy emulsions. *Food Hydrocolloids*, 63, 189-200.
- Lima, E. C. D. O., Alcantara, G. B., Damasceno, F. C., Moita Neto, J. M., & Galebeck, F. (2010). Fracionamento de polifosfato de sódio e caracterização

por RMN de 31P: um experimento para aulas de físico-química. *Química Nova*, 33, 1991-1995.

McCarthy, N. A., Power, O., Wijayanti, H. B., Kelly, P. M., Mao, L., & Fenelon, M. A. (2017). Effects of calcium chelating agents on the solubility of milk protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, 70(3), 415-423.

McMahon, D. J., & McManus, W. R. (1998). Rethinking casein micelle structure using electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2985-2993.

Mizuno, R., & Lucey, J. A. (2005). Effects of emulsifying salts on the turbidity and calcium-phosphate-protein interactions in casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3070-3078.

Mizuno, R., & Lucey, J. A. (2007). Properties of milk protein gels formed by phosphates. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4524-4531.

Nogueira, M. H., Humblot, L., Singh, R. P., Dieude-Fauvel, E., Doumert, B., Nasser, S., Lesur, C., Karoui, R., Delaplace, G. & Peixoto, P. P. S. (2021). The heterogeneous substructure of casein micelles evidenced by SAXS and NMR in demineralized samples. *Food Hydrocolloids*, 117, 106653.

Orlien, V., Boserup, L., & Olsen, K. (2010). Casein micelle dissociation in skim milk during high-pressure treatment: Effects of pressure, pH, and temperature. *Journal of dairy science*, 93(1), 12-18.

Pandalaneni, K., Amamcharla, J. K., Marella, C., & Metzger, L. E. (2018). Influence of milk protein concentrates with modified calcium content on enteral dairy beverage formulations: Physicochemical properties. *Journal of dairy science*, 101(11), 9714-9724.

Power, O. M., Fenelon, M. A., O'Mahony, J. A., & McCarthy, N. A. (2019). Dephosphorylation of caseins in milk protein concentrate alters their interactions with sodium hexametaphosphate. *Food chemistry*, 271, 136-141.

Power, O. M., Fenelon, M. A., O'Mahony, J. A., & McCarthy, N. A. (2020). Influence of sodium hexametaphosphate addition on the functional properties of milk protein concentrate solutions containing transglutaminase cross-linked proteins. *International Dairy Journal*, 104, 104641.

Ramchandran, L., Luo, X., & Vasiljevic, T. (2017). Effect of chelators on functionality of milk protein concentrates obtained by ultrafiltration at a constant pH and temperature. *Journal of Dairy Research*, 84(4), 471-478.

Ranadheera, C. S., Liyanaarachchi, W. S., Dissanayake, M., Chandrapala, J., Huppertz, T., & Vasiljevic, T. (2019). Impact of shear and pH on properties of casein micelles in milk protein concentrate. *Lwt*, 108, 370-376.

Shinde, A. P., Meena, G. S., & Handge, J. U. (2021). Effect of sodium triphosphate and sodium hexametaphosphate on properties of buffalo milk protein concentrate 60 (BMPC60) powder. *Journal of Food Science and Technology*, 58(5), 1996-2006.

Silva, N. N., Casanova, F., Pinto, M. D. S., Carvalho, A. F. D., & Gaucheron, F. (2019). Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22.

Sinaga, H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Effects of milk pH alteration on casein micelle size and gelation properties of milk. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 179-197. Singh, H. (2004). Heat stability of milk. *International journal of dairy technology*, 57(2-3), 111-119.

Trejo, R., Dokland, T., Jurat-Fuentes, J., & Harte, F. (2011). Cryo-transmission electron tomography of native casein micelles from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 94(12):5770-5775.

Waugh, D. F. (1958). The interactions of  $\alpha$  s- $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins in micelle formation. *Discussions of the Faraday Society*, 25, 186-192.

Wolfschoon-Pombo, A. F., Böttger, D., & Lösche, K. (2012). Pufferkapazität mikrofiltrierter Magermilchkonzentrate. *Chemie Ingenieur Technik*, 4(84), 465-474.

Xu, Y., Liu, D., Yang, H., Zhang, J., Liu, X., Regenstein, J. M. & Zhou, P. (2016). Effect of calcium sequestration by ion-exchange treatment on the dissociation of casein micelles in model milk protein concentrates. *Food Hydrocolloids*, 60, 5.

Ye, R., & Harte, F. (2013). Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl<sub>2</sub> on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of dairy science*, 96(2), 799-805.