BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY

Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite

Review: Structural and Physicochemical Properties of Milk Proteins

AUTORES
AUTHORS

✉ **Valdemiro Carlos SGARBIERI**
FEA/UNICAMP - DEPAN - R. Monteiro Lobato, 80
13083-862 - Campinas/SP

RESUMO

O presente artigo é uma revisão atualizada sobre o conhecimento das estruturas (primária, secundária, terciária) das caseínas e das proteínas do soro de leite, particularmente do leite bovino. As caseínas são fosfoproteínas que, em sua forma natural, apresentam-se formando agregados ou partículas (micelas) contendo as caseínas α_{S1}, α_{S2} e β, em sua parte central, e a caseína κ, que se distribui em parte no corpo da micela e em parte na superfície, conferindo-lhe estabilidade físico-química. As unidades estruturais da micela (submicelas) são unidas pela presença de fosfato de cálcio coloidal. As proporções das diferentes caseínas nas micelas são: 3:1:3:1 para α_{S1}, α_{S2}, β e κ caseínas, respectivamente. As caseínas, particularmente α_{S1}, α_{S2} e β, são proteínas de estruturas abertas com predominância de estruturas primárias (randomizadas) e secundárias, em folhas e muito pouca estrutura em α-hélice, o que se deve, em parte, ao elevado conteúdo de prolina distribuída regularmente em toda a cadeia polipeptídica. A estrutura aberta e flexível confere às caseínas excelente propriedade surfactante na formação de emulsões e espuma, na formação de géis e resistência térmica à desnaturação. As estruturas terceárias das caseínas ainda não foram completamente determinadas. Em contrapartida, as proteínas do soro apresentam-se como moléculas individualizadas, solúveis, com estruturas terceárias já bastante conhecidas. Em suas estruturas terceárias, as formas secundárias em α-hélice e folhas β são alternadas com segmentos de estrutura primária. São menos resistentes ao tratamento térmico, sofrendo vários graus de desnaturação em temperaturas acima de 70 °C. Apresentam excelentes propriedades funcionais, incluindo solubilidade em toda a faixa de pH e força iônica, boa capacidade de geleificação, emulsificação e espuma, excelente valor nutritivo e várias propriedades fisiológicas importantes. O artigo descreve resumidamente várias enzimas de ocorrência natural no leite, algumas de importância para a tecnologia e controle da qualidade dos produtos lácteos.

SUMMARY

This article represents an updated overview of current knowledge on the structures (primary, secondary, tertiary) and some physicochemical properties of casein and the milk whey proteins, mainly those of bovine milk. The casein fractions are phosphoproteins which, in their natural form, appear as colloidal particles (micelles) formed by α_{S1}, α_{S2} and β casein in the core, and κ-casein, which is distributed partly in the micelle mass and partly at its surface, being responsible for the physicochemical stability of the micelle. The casein structural units (submicelles) are held together by colloidal calcium phosphate. The proportions of the various casein fractions in the micelle structure are 3:1:3:1 respectively for α_{S1}, α_{S2}, β and κ casein. The casein fractions, particularly α_{S1}, α_{S2} and β-casein, are proteins with relatively open structures and a predominance of primary (randomised) and secondary (β-sheet) structures, with a limited proportion of α-helical structure, due mainly to the high content of proline distributed regularly along the polypeptide chains. The open, flexible structure of the casein molecules is responsible for its excellent surfactant properties in emulsions and foams, its gelling properties and its thermal resistance to denaturation. The tertiary structures of the casein fractions are still not completely determined. On the other hand, the whey proteins are individualised, soluble molecules, whose tertiary structures are well known. In these tertiary structures, the α-helical and β-sheet secondary structures alternate with primary structure segments. Whey proteins are less heat stable than casein, undergoing various degrees of denaturation at temperatures above 70 °C. Whey proteins show excellent functional properties including solubility at a wide range of pH and ionic strength values, good gelling, emulsification and foaming properties, excellent nutritive value and various important physiological properties. The article also summarises some of the properties of various milk enzymes which are of importance in dairy product technology and quality control.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

Caseína; Proteínas do soro; Propriedades estruturais; Propriedades físico-químicas

Casein, Whey proteins, Structural properties, Physicochemical properties.

Recebido / Received: 23/08/2004. Aprovado / Approved: 14/02/2005.

1. INTRODUÇÃO

O leite apresenta-se como uma emulsão líquida em que a fase contínua é formada de água e substâncias hidrossolúveis ao passo que a fase interna ou descontínua é formada, principalmente, de micelas de caseína e de glóbulos de gordura.

O leite de vaca, o mais importante do ponto de vista comercial e industrial, é composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas.

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000).

As proteínas do leite constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Suas propriedades nutritivas e tecnológicas derivam da composição em aminoácidos que atendem à maioria das exigências fisiológicas do ser humano (CHEFTEL *et al.*, 1989; SWAISGOOD, 1982) e de suas propriedades físico-químicas, que proporcionam propriedades funcionais de grande interesse tecnológico como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade de espuma, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (MODLER, 2000; WONG *et al.*, 1996).

Do ponto de vista nutritivo e industrial, as proteínas do leite de mais ampla aplicação e valor econômico são as caseínas e as proteínas do soro. A concentração de proteína total e a relação entre caseína e proteína de soro são muito variáveis entre as espécies, como exemplificam os dados da Tabela 1 (SGARBIERI, 1996; BOUNOUS *et al.*, 1988). Observa-se (Tabela 1) uma variação de 1,4 a 12,0% de proteína em leites de diversas espécies. Observa-se ainda uma variação na relação caseínas: proteínas do soro na faixa de 0,2 (leite humano) a 6,3 (leite de cabra). No leite de vaca essa relação é de aproximadamente 80% para caseína e 20% para as proteínas do soro, ao passo que no leite humano essa relação é inversa.

Para o leite de vaca observa-se ainda que o primeiro produto das glândulas mamárias (colostro) é muito rico em proteína (19,2%) sendo 2,65% de caseína e 16,56% de imunoglobulinas. As imunoglobulinas são anticorpos transmitidos passivamente ao recém-nascido, conferindo-lhe o que se chama de imunidade passiva. Após 72 horas do nascimento, a secreção láctea já adquiriu sua composição típica com cerca de 3,3 a 3,5% de proteína, sendo apenas 0,7 a 0,9% de proteínas de soro (Tabela 1) (SGARBIERI, 1996).

O objetivo da revisão que se segue é enfatizar as diferenças de composição, estruturais e conformacionais existentes entre as proteínas do leite, particularmente as duas principais classes de proteínas, as caseínas e as proteínas do soro de leite.

TABELA 1. Teor e distribuição de proteínas em várias espécies de mamíferos.

Espécie (tipo)	Proteína (%)	Caseína/Proteína de soro
Mulher	1,4	0,2
Cabra	3,9	6,3
Búfala	5,2	4,6
Veada	10,3	–
Elefanta	3,1	0,6
Cadela	0,3	2,5
Coelha	11,5	4,4
Baleia	12,0	2,0
Vaca		
Leite	3,3	4,7
Colostro (0 h)	2,65* 16,56**	
Colostro (72 h)	3,33* 1,03**	

* Caseína; ** Imunoglobulina

Fonte: SGARBIERI (1996); LOURENÇO (2000).

O conhecimento das diferenças estruturais e das propriedades físico-químicas entre as várias formas de caseína e as proteínas do soro é indispensável para a compreensão do comportamento tecnológico e funcional, nutritivo e fisiológico dessas proteínas, como parte de um sistema alimentício.

2. CASEÍNAS

As caseínas são classificadas em quatro subgrupos: caseínas α, β, κ e γ, sendo que as caseínas α formam uma família de proteínas com características diferentes (α_{S0} a α_{S5}). Dentro de cada grupo de caseínas aparecem ainda variantes genéticas, como ilustra a Tabela 2 (SGARBIERI, 1996).

TABELA 2. Principais características físico-químicas das caseínas do leite de vaca.

Fração protéica	Porcentagem no leite desnatado	pI	Sedimentação (S_{20})	Peso molecular	Variantes genéticas*
Caseína α_{S1} (α_{S0}, α_{S2}, α_{S3}, α_{S4}, α_{S5})	45 - 55	4,1	3,99	23.613	A, B, C, D
Caseína β	25 - 35	4,5	1,57	24.000	A_1, A_2, A_3, B, C, D
Caseína κ	8 - 15	4,1	1,4	19.000	A, B
Caseína - γ	3 - 7	5,8	1,55	21.000	
γ_1				20.500	A_1, A_2, A_3, B
γ_2				11.800	A_1 ou A_2, A_3, B
γ_3				11.500	A_1 ou A_2 ou A_3, B

* Possui pelo menos um resíduo de aminoácido diferente na cadeia polipeptídica; pI = pH no ponto isoelétrico; (S_{20}) = coeficiente de sedimentação a 20 °C; peso molecular em daltons.

As variantes genéticas são mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na seqüência primária da cadeia

polipeptídica. A Tabela 2 mostra ainda a distribuição porcentual e alguns parâmetros físico-químicos das caseínas, como pH isoelétrico (pI), coeficiente de sedimentação a 20 °C e pesos moleculares. Algumas diferenças quantitativas entre as caseínas do leite bovino e do leite humano são mostradas na Tabela 3 (CHEFTEL *et al.*, 1989; MODLER, 2000).

TABELA 3. Distribuição de caseínas nos leites bovino e humano.

Caseínas (g/L)	Leite bovino	Leite humano
Caseínas totais	26,0	3,2
α - S_1	10,0	Desprezível
α - S_2	2,6	Desprezível
β	9,3	2,2
κ	3,3	1,0
γ	0,8	Desprezível

Fonte: MODLER (2000)

Em razão da composição e da seqüência de aminoácidos característicos, as caseínas α e β apresentam estruturas flexíveis com baixíssimo grau de estrutura secundária (α-hélice) e com menos de 10% de estrutura em conformação β (folhas β). Essa característica estrutural, estrutura relativamente aberta e flexível das caseínas, deve-se ao elevado teor de prolina (Pro), cerca de 8,5% uniformemente distribuída ao longo da cadeia polipeptídica. A prolina tem a propriedade de interromper a continuidade da estrutura secundária, particularmente a α-hélice, promovendo uma estrutura bastante randomizada e com baixo grau de estrutura secundária. Em contrapartida, as estruturas terceárias das moléculas de caseína ainda não foram suficientemente esclarecidas.

As caseínas são fosfoproteínas contendo número variável de radicais fosfato ligados à serina (P-Ser), concentrados em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas, originando nas moléculas regiões mais hidrofílicas ou mais hidrofóbicas (caráter anfifílico). Como resultado, as caseínas são mais suscetíveis à proteólise e difundem-se mais rápida e fortemente em interfaces do que as proteínas do soro de leite. A caseína κ apresenta-se mais hidrofílica apesar de apresentar apenas um radical fosforilserina, por possuir carboidrato na molécula (glicopeptídio), caracterizando-se como uma P-glicoproteína (SWAISGOOD, 1982; WONG *et al.*, 1996; BUNNER, 1977).

Caseínas α_{S1} e α_{S2}: a separação por eletroforese da caseína total do leite bovino revela a presença de proteínas de migração rápida, fora da zona de migração da β-caseína, designadas caseínas α_S. Estas são agrupadas em duas famílias α_{S1} e α_{S2}. A α_{S1} é constituída por duas proteínas, caseínas α_{S0} e α_{S1}, cujas seqüências de aminoácidos das estruturas primárias são idênticas. A caseína α_{S1} é a principal e por isso esse grupo é referido como α_S. A família α_{S2} tem cinco membros (α_{S2}, α_{S3}, α_{S4}, α_{S5} e α_{S6}), cujas mobilidades eletroforéticas se situam entre as caseínas α_{S1} e β. A caseína α_{S5} é um dímero formado por α_{S2} e α_{S4}, unidas por ligação dissulfeto.

A caseína α_{S1} é constituída de uma cadeia polipeptídica com 199 resíduos de aminoácidos e PM de 23,6 kDa. Três regiões de sua seqüência primária são formadas por resíduos com cadeias laterais apolares, regiões apolares ou hidrofóbicas, situadas entre os resíduos de aminoácidos 1 – 44, 90 – 133, 132 – 199; e uma região polar ácida em forma de alça, que contém muitos resíduos de aminoácidos com cadeias laterais carregadas, localizadas entre os resíduos 41 – 80, onde se localizam sete dos oito resíduos fosforilserina e onde se concentra a carga líquida da proteína. As regiões apolares e a região polar interagem com as demais caseínas do núcleo das micelas: as primeiras por interação hidrofóbica e a elevada hidrofobicidade do segundo peptídio entre os resíduos 100 – 199, responsável pela forte tendência de associação da caseína α_{S1}; já a segunda, região polar, interage por meio de pontes de cálcio e interações eletrostáticas. A estrutura primária da caseína α_{S1} (B), com indicação das variantes genéticas (A, C e D) é ilustrada na Figura 1.

Algumas seqüências de aminoácidos da estrutura primária da família α_S apresentam similaridades com seqüências

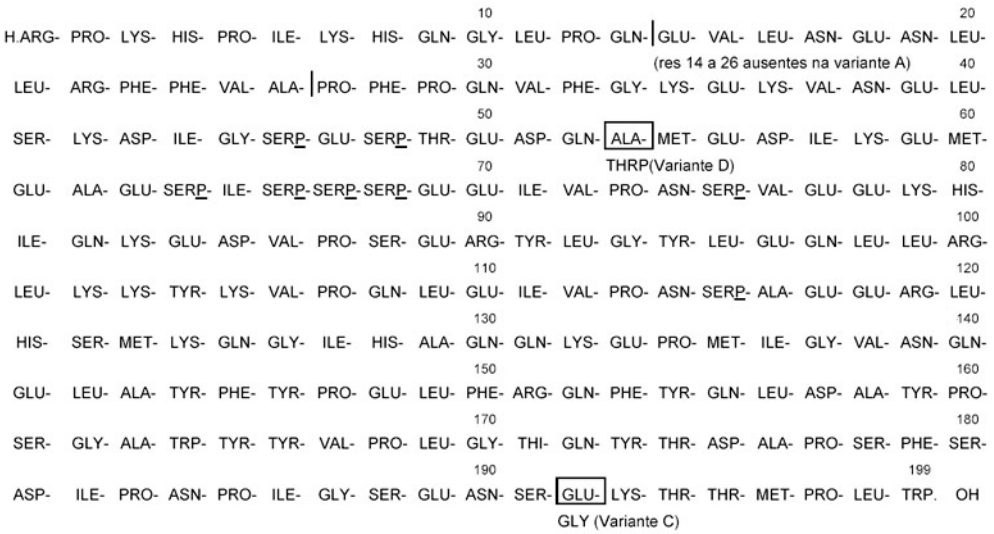

FIGURA 1. Estrutura primária da caseína α_{S1} (variante B) com indicação das variantes A, C e D. Adaptado de BUNNER (1977).

parciais da estrutura primária da caseína β. A região apolar (res 25 – 39) da caseína α_{S1} é muito semelhante àquela formada pelos resíduos 83 – 100 da caseína β e a região com cadeias laterais polares e carregadas, entre os resíduos de aminoácidos 62 – 70 com os grupos fosforil, assemelha-se à seqüência 13 – 21 da caseína β. A caseína α_{S1} tem hidrofobicidade média de 1.172 cal/res, valor típico de proteína solúvel em água, com elevada carga líquida (-21 mV). Por causa dessa carga líquida no pH natural do leite e da baixa hidrofobicidade, suas moléculas não se agregam extensivamente na ausência de Ca^{++}. Quantitativamente, a caseína α_{S1} é a principal proteína do leite bovino, sendo insolúvel nas condições de pH, temperatura e força iônica que ocorrem naturalmente no leite.

As caseínas α_{S2} apresentam PM na faixa de 23,5 a 24 kDa e uma cadeia polipeptídica com 207 resíduos de aminoácidos e, contêm mais resíduos com cadeias laterais carregadas do que a caseína α_{S1}. Por isso apresentam baixa hidrofobicidade média (1.111 cal/res) e carga líquida (entre -16 e -21 mV), com boa solubilidade em água, sendo a mais hidrofílica das caseínas.

Os resíduos fosforil em número de 10 a 13 estão agrupados em três segmentos, 8 – 16, 56 – 61, 129 – 133. Já os resíduos apolares se encontram nas porções 90 – 120 e 160 – 207 (seqüência carboxiterminal). Trata-se de proteína calciossensível que se agrega na presença deste íon.

Caseínas β: representam 30 – 35% do total das caseínas. Na presença de Ca^{++} formam suspensões coloidais ao invés de precipitarem, como as caseínas α_{S1}. As caseínas β apresentam temperatura, concentrações e pH em que ocorre equilíbrio, associação – dissociação. A temperaturas abaixo de 8 °C ou em valores elevados de pH, ocorre a dissociação a monômeros. Em temperaturas elevadas e pH próximo da neutralidade, ocorre a formação de polímeros em forma de contas.

A família das caseínas β é constituída de um membro principal com no mínimo sete variantes genéticas e oito pequenos fragmentos protéicos, formados por hidrólise enzimática do componente principal. A diferenciação das variantes é feita por eletroforese em gel de uréia ácida, de acordo com a seguinte ordem de mobilidade: $A^1 + A^2 = A^3 > B > C$. A proteína principal tem peso molecular de 24 kDa e uma cadeia polipeptídica formada de 209 resíduos de aminoácidos cujo valor de hidrofobicidade média é de 1.334 cal/res, sendo a mais hidrofóbica das caseínas. A parte carboxiterminal da molécula (res 136 – 209) contém muitos resíduos apolares, ao passo que a região entre os resíduos 1 a 135, com cinco resíduos fosforil, contém toda a carga líquida da proteína. Apenas os cinco resíduos aminoterminais possuem uma apreciável proporção de resíduos hidrofílicos e de resíduos com cargas elétricas. Dessa forma, os resíduos polares e apolares da estrutura primária estão agrupados em seqüências localizadas em regiões distantes da cadeia. Por causa dessa distribuição de seus aminoácidos, a molécula assemelha-se a detergente aniônico, sendo um agente emulsificante eficaz. A estrutura secundária é formada de 10% α-hélice, 13% folhas β e 77% de estrutura randomizada. Esse porcentual elevado de estrutura aperiódica pode ser explicado, em parte, pela distribuição uniforme de resíduos prolil (Pro) na estrutura primária. A estrutura primária da caseína β é suscetível de hidrólise pela protease plasmina nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28 – 29, 105 – 106 e 107 – 108, produzindo fragmentos peptídicos referidos na literatura como caseínas γ, que permanecem nas micelas, além de pequenos fragmentos que se difundem para a fase líquida (soro), constituindo uma parte da fração proteose-peptona.

A representação da seqüência primária da caseína β (A^2) indicando as variantes genéticas (A^3, B e C) e os pontos de clivagem para a formação das caseínas γ, é ilustrada na Figura 2.

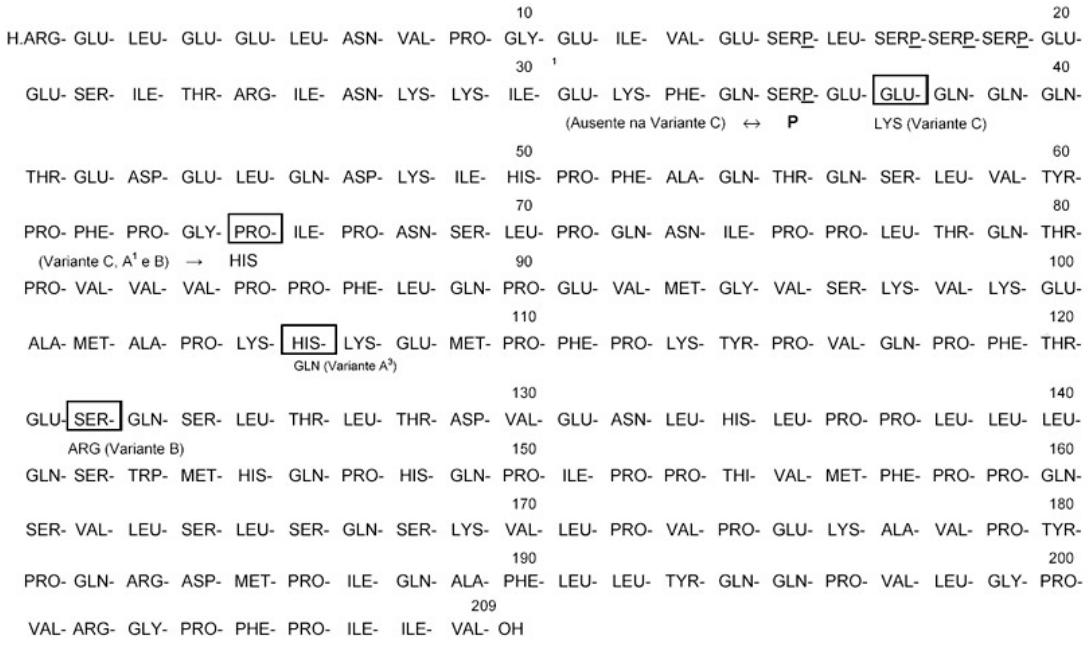

FIGURA 2. Seqüência primária da caseína β (A^2), ilustrando ainda as mutações para as caseínas A^3, B e C e as clivagens para formação de caseínas γ. Fragmento (29-105) caseína γ^1; Fr (29-108) caseína γ^2; Fr (107-209) caseína γ^3. Adaptado de BUNNER (1977).

Caseínas κ: essa caseínas têm os resíduos de aminoácidos dicarboxílicos localizados em sua seqüência na região carboxiterminal, que é também glicosilada. Em geral, três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina ou ácido N-acetil neuramínico), formando tri ou tetrassacarídeos, ligados aos resíduos treonil 131, 133, 135 ou 136, constituem a parte glicosídica da molécula. A estrutura secundária e/ou terceária parece ser o fator primordial na determinação dos sítios de glicosilação, sendo a única caseína glicosilada.

A região carboxiterminal da seqüência primária, solúvel na fase soro, designada glicomacropeptídio (GMP), concentra os resíduos de aminoácidos ácidos e a maioria dos hidrófilos. Os resíduos de aminoácidos básicos e os apolares estão agrupados na região aminoterminal, compondo uma região apolar e insolúvel denominada para-κ-caseína. A caseína κ, em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas, atua como estabilizadora dessas partículas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao Ca^{++} por ação dos sais de cálcio do leite. A solubilidade da caseína κ não é afetada pela presença do Ca^{++}. A região da seqüência primária da para-κ-caseína, por ser de natureza apolar, orienta-se para o interior das micelas e interage, por meio de grupos hidrofóbicos, com as caseínas α_S e β dispostas no núcleo da micela, ao passo que o glicomacropeptídio (GMP), em virtude de sua polaridade, orienta-se para a fase soro, interagindo com a água. Essas interações da seqüência primária da caseína κ estabilizam as micelas no leite.

A hidrólise enzimática que ocorre na manufatura do queijo ou o tratamento térmico em temperaturas elevadas resultam na remoção ou dissociação da caseína κ da superfície das micelas, eliminando a estabilização eletrostática e estérica da superfície micelar e aumentando a hidrofobicidade de superfície, o que resulta em agregação das micelas e formação de coágulo.

A estrutura secundária da caseína κ é formada por cinco regiões em α-hélice (23% do total), sete regiões em folhas β (31% do total) e dez regiões em alças em conformação β (24%). A estrutura secundária do segmento para-κ-caseína é muito ordenada, sobretudo as regiões em folhas β entre os resíduos de aminoácidos 22 – 32 e 40 – 56, e contém dois resíduos cisteinil (cysSH), provavelmente nas voltas β, suscetíveis à oxidação e à reação de intercâmbio sulfidrilo-dissulfeto (CysSH/Cys-S-S-Cys).

De todas as caseínas a caseína κ é a menos fosforilada (1P), de estrutura mais estável e mais ordenada, embora contenha muitos resíduos prolil. Possui apenas um resíduo fosforil (Ser<u>P</u>-149), localizado no segmento glicomacropeptídio (GMP). É a única caseína que não precipita na presença de Ca^{++}, ligando dois moles de Ca^{++} por mole de proteína, em pH neutro.

Cada monômero de caseína κ tem PM de 19 kDa, mas no leite as moléculas encontram-se agregadas em polímeros de PM entre 60 e 150 kDa, formados pela interação das variantes genéticas A e B por ligação dissulfeto. Essa interação pode prosseguir por meio de interações não-covalentes até polímeros de peso molecular de 650 kDa. Os monômeros apresentam considerável heterogeneidade estrutural, por causa das variantes genéticas, podendo ainda apresentar diferentes conteúdos de carboidrato e de fosfato. A caseína κ é rica em resíduos prolil (14 res/mole proteína) e isoleucil, tem carga líquida baixa (-3 mV) e hidrofobicidade de 1.310 cal/res, o que a caracteriza como proteína hidrofóbica.

A seqüência primária da caseína κ (B), com indicação das substituições para a variante A e do ponto de clivagem (Phe 105 – Met 106) da enzima coagulante renina, é ilustrada na Figura 3.

Micelas de caseína: no leite, as micelas de caseína apresentam-se altamente hidratadas (3,7 g ou 4,4 mL de água) por grama de caseína. As micelas medem de 500 a 3.000 angstroms de diâmetro e apresentam peso molecular da ordem de 2,5 x 10^8 daltons. São formadas de 93% (p/p) de caseínas em que α_{s1}, α_{s2}, β e κ estão nas proporções 3:1:

10
PYROGLU- GLU (GLN)- GLN- ASN- GLN (GLU)- GLU- GLN (GLU)- PRO- ILE- ARG- CYS- GLU- LYS ASP- GLU-
20 30
PHE- PHE- SER- ASP- LYS- ILE- ALA- LYS- TYR- ILE PRO- ILE- GLN- TYR- VAL- LEU- SER- ARG- TYR-
40 50
SER- TYR- GLY- LEU- ASN- TYR- TYR- GLN- GLN- LYS- PRO- VAL- ALA- LEU- ILE- ASN- ASN- GLN- PHE-
60 70
PRO- TYR- PRO- TYR- TYR- ALA- LYS- PRO- ALA- ALA- VAL- ARG- SER- PRO- ALA- GLN- ILE- LEU- GLN-
80 90
GLN- VAL LEU- SER- ASP (ASN)- TRH- VAL- PRO- ALA- LYS- SER- CYS- GLN- ALA- GLN- PRO- TRH- TRH-
100 (Renina) 110
ALA- ARG- HIS- PRO- HIS- PRO (HIS)- HIS- LEU- SER- PHE- | MET- ALA- ILE- PRO- PRO- LYS- LYS- ASN-
120 130
ASP- LYS- THR- GLU- ILE- PRO- THR- ILE- ASN- THR- ILE- ALA- SER- GLY- GLU- PRO- THR- SER- THR-
140 150
THR- ILE- GLU- ALA- VAL- GLU- SER- THR- VAL ALA- THR- LEU- GLU- ALA- SERP- PRO- GLU- VAL- ILE-
THR (Variante A) ASP (Variante A)
160 169
SER- PRO- PRO- GLU- ILE- ASN- THR- VAL- GLN- VAL- THR- SER- THR- ALA- VAL- OH

FIGURA 3. *Seqüência primária da caseína κ (B), ilustrando as substituições para a variante A e o ponto de clivagem (Phe 105 – Met 106) da enzima coagulante renina. Adaptado de BUNNER (1977). Duas cisteínas (Res 11 e 88) e 1 SERP (Res 149).*

3:1. Os restantes 7% do peso das micelas constam de cálcio inorgânico (2,87%), fosfato (2,89%), citrato (0,4%) e pequenas quantidades de magnésio, sódio e potássio (SCHMIDT, 1980; ROLLEMA, 1992).

As micelas de caseína apresentam estrutura supramolecular, cujo arranjo molecular ainda não foi totalmente esclarecido. Vários modelos são encontrados na literatura para representar as micelas de caseína. Uma revisão do desenvolvimento histórico dos conceitos sobre a formação e a estrutura das micelas de caseína foi publicada por ROLLEMA (1992). Nos últimos anos tem ganhado suporte a estrutura proposta por WALSTRA (1999), com as seguintes características: a) a micela apresenta-se essencialmente esférica, contudo sua superfície não se apresenta lisa; b) é formada de unidades menores denominadas submicelas, contendo principalmente caseína, mas apresenta composição mista; c) as submicelas variam em composição, existindo particularmente dois tipos principais, isto é, um tipo formado pelas caseínas α_s, β e κ e outro formado pelas caseínas α_s e κ; d) as submicelas parecem permanecer ligadas por aglomerados (*clusters*) de fosfato de cálcio; e) dessa forma, as submicelas se agregam até a formação completa da micela, em que a caseína κ se posiciona na superfície da micela; f) a porção C-terminal da caseína κ (glicopeptídio) projeta-se para fora da superfície da micela, formando uma camada esponjosa que previne, por repulsões estéricas e eletrostáticas, qualquer agregação posterior de submicelas.

Na Figura 4, observa-se uma micela em corte transversal, mostrando a estrutura em submicelas, as cadeias polipetídicas da caseína κ se projetando da superfície e os aglomerados de fosfato de cálcio que servem como "cimento" para manter as submicelas ordenadas (WALSTRA, 1999).

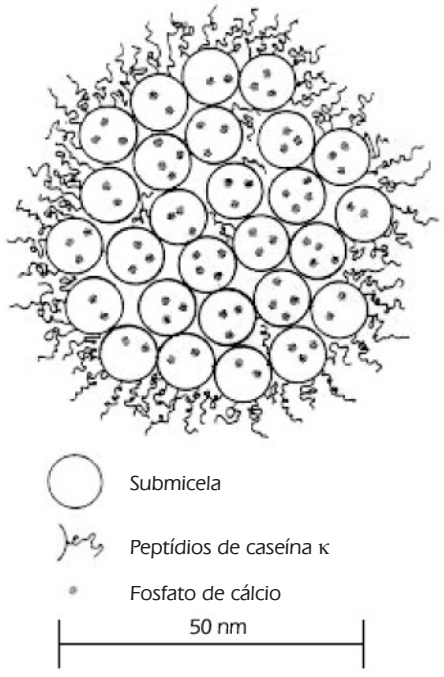

FIGURA 4. Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídios de caseína κ, recobrindo a superfície da micela.

Nas micelas de caseína, a auto-associação molecular depende muito da temperatura do meio, do pH e da concentração de Ca^{++}. A 4 °C, se o pH natural do leite (6,68) é diminuído para 5,1-5,3, parte da caseína β dissocia-se da estrutura protéica micelar, passando para o soro. A dissociação é atribuída ao rompimento das interações hidrofóbicas intermoleculares, que são mínimas em temperaturas abaixo de 5 °C. Abaixando-se ainda mais o pH, a dissociação ocorre também pela dissolução do fosfato de cálcio coloidal (LOURENÇO, 2000).

Métodos para a separação das caseínas e do soro: existem métodos para isolamento das caseínas que podem ser aplicados em nível de laboratório. Micelas de caseína intactas, com os íons Ca^{++} associados, podem ser coletadas por centrifugação do leite desnatado em alta força centrífuga e 37 °C. Contudo, cerca de 5 a 20% das caseínas mantêm-se solúveis no sobrenadante (BUNNER, 1977). As caseínas também podem ser separadas por "*salting out*" com sulfato de amônio a 2 °C (26,4 g/100 mL de leite), precipitando-se conjuntamente pequenas quantidades de proteínas do soro. Três processos encontram aplicação industrial, a saber: a) precipitação pela acidificação com ácido orgânico ou mineral no pH 4,6 (pI), 20 °C, seguido de centrifugação para a obtenção da caseína isoelétrica e de soro ácido. A caseína isoelétrica poderá ser transformada em caseinato pela ressolubilização em soluções de vários tipos de base e desidratada em "*spray dryer*"; b) a coagulação enzimática da caseína por preparados enzimáticos comerciais, para obtenção de coágulo e de soro "doce". O coágulo, depois de separado do soro, é usado como matéria-prima na produção de queijos. Nesse processo, o glicomacropeptídio (GMP) passa para a fase líquida (soro) e a parte restante da caseína (para-κ-caseína) fica retida no coágulo; c) o terceiro processo é baseado na separação física das micelas intactas de caseína por membranas, obtendo-se como produto a caseína na forma micelar e o soro natural, sem nenhuma alteração por agentes químicos ou enzimáticos (MODLER, 2000; RENNER & EL-SALAM, 1991; HÄUSEL *et al.*, 1990; ZINSLY *et al.*, 2001).

3. PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

As proteínas remanescentes no soro de leite apresentam excelente composição em aminoácidos, alta digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, portanto elevado valor nutritivo (SGARBIERI, 1996; ZINSLY *et al.*, 2001). Em contrapartida, apresentam também excepcionais propriedades funcionais de solubilidade, formação e estabilidade de espuma, emulsibilidade, geleificação, formação de filmes e cápsulas protetoras (MODLER, 2000; WONG *et al.*, 1996). Constituem um grupo bastante diversificado de proteínas com características estruturais bem diferentes (WONG *et al.*, 1996). As quantidades relativas das principais proteínas dos soros de leite bovino e humano são mostradas na Tabela 4.

A quantidade total dessas proteínas, nos dois tipos de soro, não difere muito, porém a distribuição é muito diferente. No soro de leite bovino predomina a β-lactoglobulina que praticamente não ocorre no leite humano. Todas as demais

proteínas listadas na Tabela 4 ocorrem em maior concentração no soro de leite humano que no bovino.

TABELA 4. Distribuição das principais proteínas de soro, do leite bovino e humano.

Proteínas de soro (g/L)	Leite bovino	Leite humano
- Proteínas totais	5,6	5,0
β-lactoglobulina	3,2	Desprezível
α-lactalbumina	1,2	2,8
Albumina sérica bovina (BSA)	0,4	0,6
Imunoglobulinas	0,7	1,0
Lactoferrina	0,1	0,2
Lisozima	Desprezível	0,4

Por ser a β-lactoglobulina a proteína mais abundante no soro de leite bovino e também a mais alergênica e antigênica, ela pode causar alergia em segmentos mais sensíveis da população, principalmente crianças (ROUVINEN *et al.*, 1999; SÉLO *et al.*, 1999).

Alfa-lactalbumina (α-LA), albumina de soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Igs), lactoferrina (Lf) e lisozima (LZ), predominam no soro de leite humano, sendo as proteínas que oferecem maior proteção à saúde (MCINTOSH *et al.*, 1998).

Estrutura e funcionalidade

β-lactoglobulina (βLG): é uma proteína globular de PM 18.362 Da para a variante genética A e 18.276 para a variante B, contendo 162 resíduos de aminoácidos. A estrutura primária da β-lactoglobulina A, com indicações para as variantes B e C e das ligações dissulfeto, é mostrada na Figura 5.

Uma das pontes dissulfeto é sempre encontrada ligando os res 66 e 160 e a outra aparece em igual distribuição entre os res 106 e 119 ou entre 106 e 121. Essa é uma situação não usual em estruturas protéicas e pode conferir propriedades de ligação singular para a β-lactoglobulina.

A estrutura secundária da β-LG consiste em folhas β antiparalelas (50%), formando nove cordas β (β-*strands*), uma porção em α-hélice (15%), estruturas casualizadas (15%) e estruturas em curvas (*turn structures*) 20% (PAPIZ *et al.*, 1986; MONACO *et al.*, 1987).

Cerca de 12 variantes genéticas já foram identificadas no soro de leite bovino, sendo as duas principais as β-LG A e B, que apresentam mutações de aminoácidos nas posições 64 e 118, sendo Asp64 e Val118 para β-LG (A) e Gly64 e Ala 118 para β-LG (B). O pI da β-LG é ao redor de pH 5,2, um pouco mais alto para a variante B que para A (PANICK *et al.*, 1999).

A conformação espacial da β-LG foi completamente elucidada por BROWNLOW *et al.* (1997). A molécula apresenta nove segmentos em folhas β antiparalelas (A a I) que se arranjam formando uma espécie de cálice ou barril achatado capaz de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas no seu interior. Esse tipo de estrutura caracteriza uma família de proteínas denominadas lipocalinas (Figura 6).

A família das lipocalinas compreende as proteínas com função de transporte (LANGE *et al.*, 1998). A estrutura particular da β-LG, do tipo lipocalina, forma uma espécie de cálice de caráter hidrofóbico que lhe confere propriedades funcionais de grande aplicação na indústria de alimentos, como capacidade de emulsificação, formação de espuma, geleificação e ligação de aroma e sabor (MORR & FOEGEDING, 1990). A estrutura da β-LG contribui para que ela seja uma proteína bastante estável em solução em uma ampla faixa de pH, apresentando, porém, diferentes estados de associação (TAULIER & CHALIKIAN, 2001). A β-LG pode passar por cinco transições induzidas pelo pH, na faixa de 1 a 13 (TAULIER & CHALIKIAN, 2001). Na faixa de pH 1 a 2 a β-LG sofre mudanças estruturais, porém retém, em grande parte, a sua estrutura secundária. A segunda transição ocorre na faixa de pH entre 2,5 e 4,0, verificando-se a passagem de dímero a monômero. Entre pH 4,5 e 6,0 ocorrem pequenas mudanças

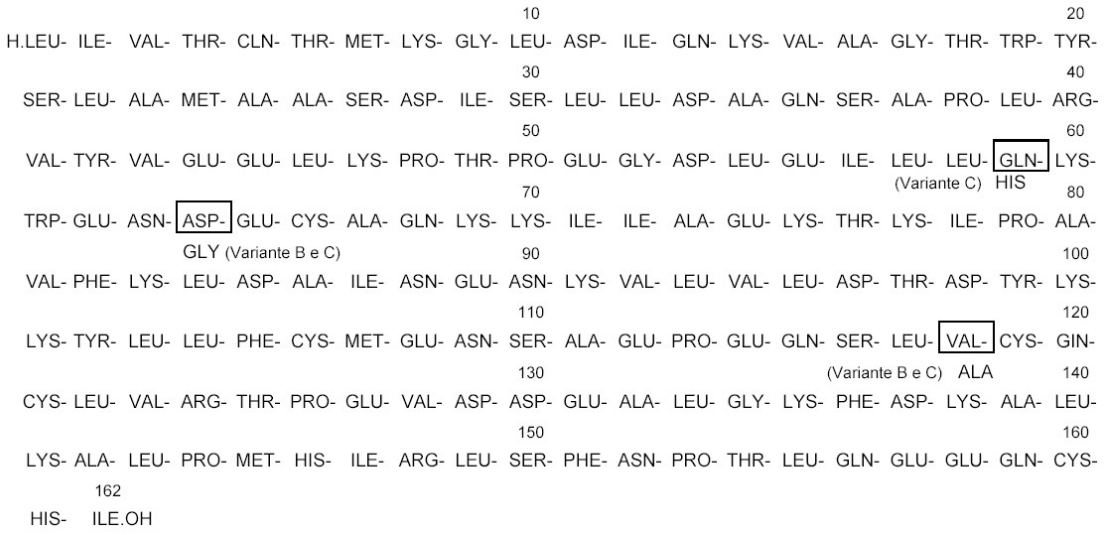

FIGURA 5. Estrutura primária da β-lactoglobulina A, diferenciando a variante A das variantes B e C. Na extremidade terceária, pontes dissulfeto formam-se entre os resíduos: Cys 66-160, Cys 106-119 ou Cys 106-121 (BUNNER, 1977).

em sua estrutura terceária, sem alteração significativa na estrutura secundária. A quarta transição ocorre entre pH 6,5 e 8,5, conhecida como transição de Tanford, que é acompanhada por alterações localizadas das estruturas secundária e terceária, sem uma mudança na conformação global da proteína. Por último, a quinta transição ocorre entre os pHs 9 e 12,5, identificada como desnaturação alcalina, e resulta na ruptura de qualquer estrutura dimérica nativa, transformando-se em monômeros desdobrados. Estima-se que aproximadamente 20% das folhas β e 10% das α-hélice sejam preservadas nessas condições (TAULIER & CHALIKIAN, 2001). A desnaturação da β-LG, induzida por base alcalina, é irreversível.

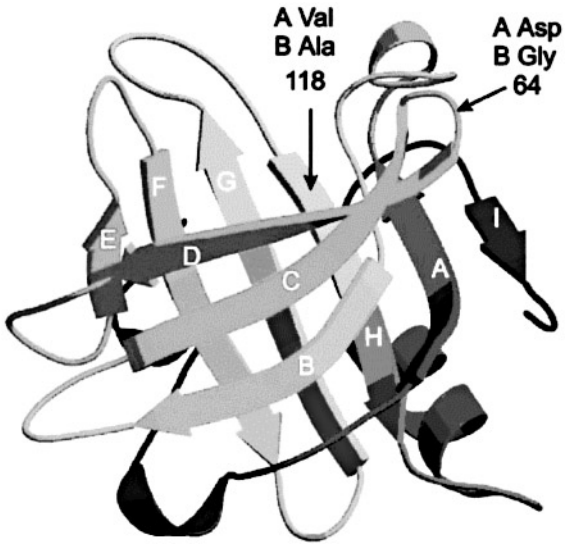

FIGURA 6. Estrutura terciária da β-lactoglobulina mostrando as estruturas secundárias, folhas β (A a I), pequena região em α-hélice e as variantes genéticas com substituições nos resíduos 64 a 118.

A β-LG é uma proteína termossensível e vários efeitos são produzidos por ação da temperatura, entre eles perda de solubilidade e exposição de regiões da molécula apropriada para diferentes tipos de interação com outros componentes, em sistemas complexos (IAMETTI *et al.*, 1996).

Modificações reversíveis começam ao redor de 50 °C e irreversíveis acima de 65-70 °C. Em pH neutro, o aquecimento origina em primeiro lugar a monomerização da proteína dimerizada (nativa), seguida de uma perda da conformação globular compacta, passando para um estado intermediário de maior flexibilidade e maior volume da estrutura terceária em que há aumento de grupos hidrofóbicos expostos ("*molten globule state*"), seguida de associação intermolecular de estruturas em folhas β, por meio de pontes dissulfeto e interações hidrofóbicas (PALAZOLO *et al.*, 2000; PHOTCHANACHAI & KITABATAKE, 2001).

De acordo com vários pesquisadores, os seguintes fenômenos ocorrem durante tratamento térmico da β-LG, em solução:

Dímero ⟷ Monômeros ⟷ Flexibilização da estrutura terciária ("*molten globule state*") → Agregação

Durante o processamento do leite em escala industrial, a β-LG é apontada como responsável pelo início do processo de agregação que conduz a uma obstrução e à conseqüente perda de eficiência dos trocadores de calor (SAWYER & KONTOPIDIS, 2000).

Fenômeno semelhante ao que ocorre com a β-LG sob ação do calor ocorre também com a aplicação de pressão (BOTELHO *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001). Em geral, pode-se dizer que entre 100-150 MPa há um começo de monomerização. Entre 140-250 MPa haveria uma modificação da estrutura secundária, mas estruturas β não são completamente destruídas até pressão de 330 MPa. Nestas condições a estrutura da β-LG apresenta grande flexibilidade e, retiradas as condições de pressão, ela se renatura (monômero modificado). À pressão de 600-900 MPa, há formação de agregados estabilizados por interações hidrofóbicas e principalmente por ligações de intercâmbio (SH → – S – S –). Em síntese, haverá:

Dímero ⟷ Monômeros ⟷ Monômeros modificados (folhas β ⟶ α-hélice "não nativa") ⟶ Agregados

Função biológica: apesar de se conhecer muito sobre a estrutura e a funcionalidade da β-LG, pouco se conhece sobre seu papel fisiológico. Em 1972, Futterman e Heller, usando técnica de fluorescência, demonstraram que a β-LG bovina, assim como a proteína ligante de retinol (RBP), forma complexos solúveis em água com retinol. A ligação de retinol com β-LG envolve principalmente interações hidrofóbicas (JANG & SWAISGOOD, 1990). A porção apolar do ligante é inteiramente responsável pela ligação e o sítio de ligação provavelmente inclui resíduos de triptofano que servem para fixar o anel da β-ionona do retinol (FUGATE & SONG, 1980). Vários estudos têm sido feitos com o propósito de definir os sítios de ligação existentes na β-LG, para o retinol, mas um consenso ainda não foi alcançado.

A β-LG tem um efeito protetor na destruição térmica do ácido ascórbico em solução aquosa (DAI-DONG *et al.*, 1990). A proteção poderia ser devida a um efeito antioxidante pela presença de grupo tiol na proteína.

Peptídios derivados da β-LG bovina podem influenciar fortemente no nível de colesterol sérico. Os peptídios induziram a supressão da absorção do colesterol, evidenciado pelo estudo com célula-Caco-2. A atividade do peptídio (Ile Ile Ala Glu Lys) exibiu maior atividade que o β-sitosterol, em ratos (NAGOKA *et al.*, 2001).

α-lactalbumina (α–LA): duas variantes genéticas de α-LA (A e B) já foram identificadas, porém somente a variante B tem sido encontrada em leite das raças bovinas ocidentais. A variante B contém 123 resíduos de aminoácidos e PM 14.176 Da, apresentando quatro pontes dissulfeto. A seqüência primária da α-LA pode ser vista na Figura 7: Cys 6-120, Cys 28-111, Cys 61-77, Cys 73-91.

A propriedade mais característica da α-LA é a forte tendência de formar associações em pH abaixo de seu pI. No pH natural do leite, pH 6,6 e acima, a α-LA apresenta-se como monômero com sua estrutura terceária.

A seqüência de aminoácidos da α-LA bovina (Figura 7) e da lisozima da clara de ovo mostram grande similaridade (VANAMAN *et al.*, 1970). A homologia de seqüência das duas

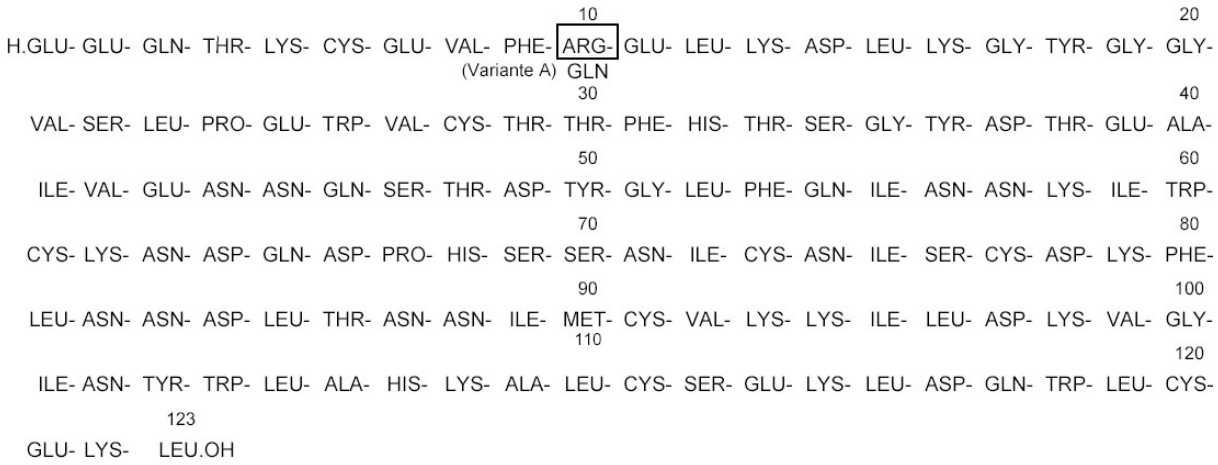

FIGURA 7. Estrutura primária da α-LA (B), com indicação da mutação para a variante A e das posições de pontes dissulfeto. Adaptado de BUNNER (1977). Posições das pontes dissulfeto: Cys 6-120, Cys 28-111, Cys 61-77, Cys 73-91.

proteínas é de 32%. Construção de modelo (BROWNE *et al.*, 1969) e simulação computacional (WARME *et al.*, 1974), ambas confirmaram a similaridade dessas duas proteínas. A similaridade na estrutura terceária entre α-LA bovina e lisozima da clara de ovo é ilustrada na Figura 8.

A molécula da α-LA tem a forma de um elipsóide, com uma profunda fenda, dividindo a molécula em dois lobos. Quatro regiões em α-hélice: A (res 5 a 10); B (res 20 a 34); C (res 86 a 99) e D (res 105 a 109), formam um lado da fenda. Duas regiões em filamentos β (40-43 e 47-50), conjuntamente com uma cadeia em forma de giro (res 58-75), formam o outro lobo. Apresenta quatro ligações dissulfídicas (Figuras 8 e 9), embora não sejam essenciais para manter a estrutura terceária da proteína.

A α-LA tem uma alta afinidade pelo Ca^{++} e outros íons metálicos como Zn^{++}, Mn^{++}, Cd^{++}, Cu^{++} e Al^{+3}. A constante

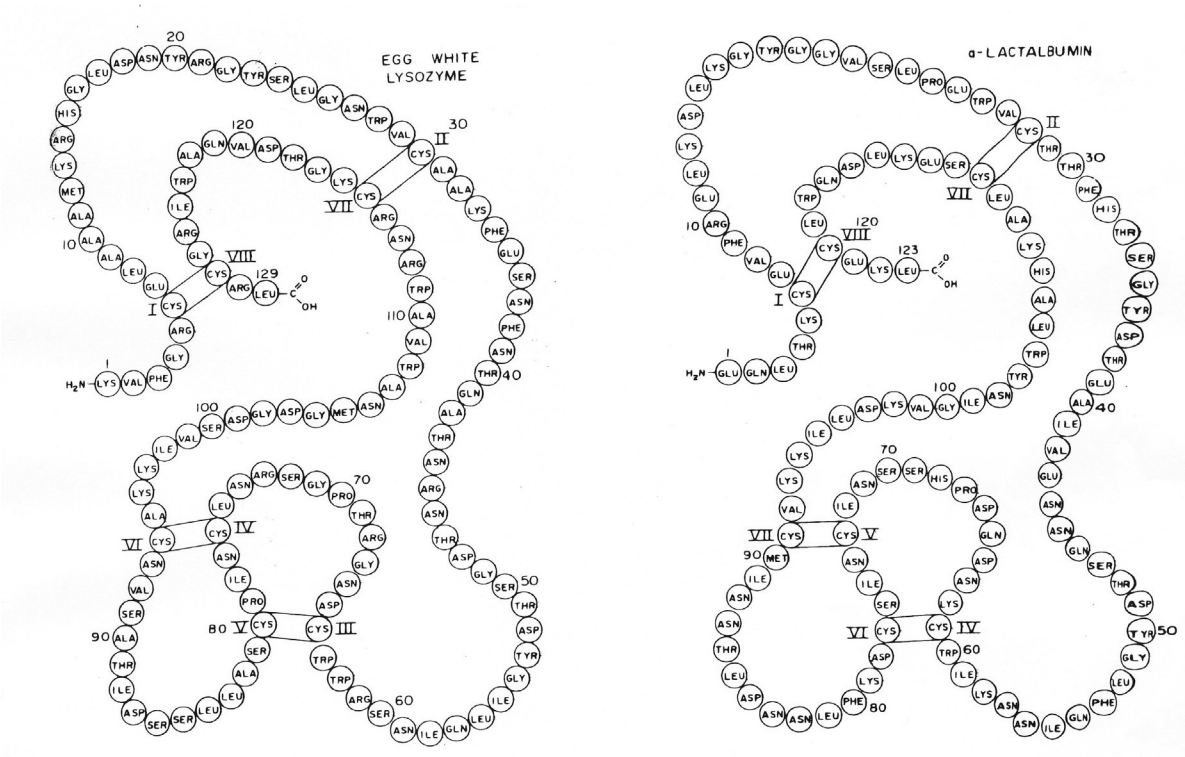

FIGURA 8. Ilustração das estruturas terceárias da α-LA bovina e da lisozima da clara de ovo com grande semelhança estrutural e 32% de homologia na estrutura primária (VANAMAN *et al.*, 1970).

de ligação para o Ca^{++} (Kap) é de 2,5 x 10^8 M^{-1}, 3 x 10^8 M^{-1} e 2,8 x 10^8 M^{-1}, respectivamente para a α-LA bovina, humana e caprina (SEGAWA & SUGAI, 1983). O giro de ligação do Ca^{++} é ligado pela ponte dissulfeto Cys 73-Cys 91. Entre os ligantes estão incluídos: dois oxigênios de cadeia da Lys 79 e do Asp 84, três oxigênios das carboxilas do Asp 82, Asp 87 e Asp 88 e duas moléculas de água (SEGAWA & SUGAI, 1983). O sítio de ligação localiza-se bem no interior da região da fenda e a ligação do cálcio funciona na estabilização da proteína contra a desnaturação térmica (STUART *et al.*, 1986). Estudos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) mostraram que a α-LA em solução sofre desnaturação reversível a 64 °C e irreversível quando aquecida em mistura com β-lactoglobulina e soralbumina bovina (BSA). No tratamento térmico severo, que causa ruptura de suas ligações dissulfeto, os grupos sulfidrilos livres reagem com grupos semelhantes da β-LG, formando ligações intermoleculares. A α-LA é solúvel na faixa de pH 4,5-5,5, porém abaixo de pH 4,0 e acima de 5,5 suas moléculas associam-se em dímeros e trímeros e agregam-se gerando polímeros com coeficientes de sedimentação na faixa de 10 a 14 S. A estrutura secundária da α-LA apresenta 26% de α-hélice, 14% de folhas β e 60% de estrutura casualizada (LOURENÇO, 2000).

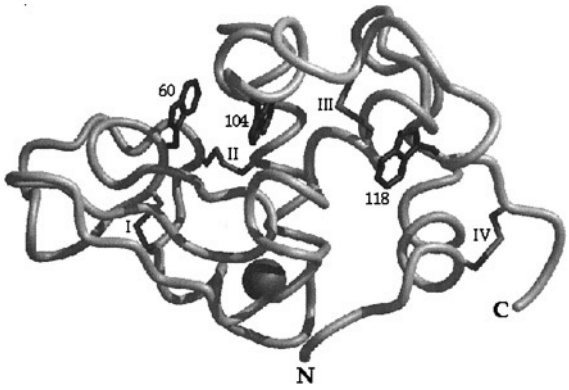

FIGURA 9. Estrutura tridimensional nativa da α-lactalbumina humana (PM 14 kDa) mostrando os terminais N e C, o átomo de cálcio ligado (esfera) e as quatro pontes dissulfeto: I, res 61-77; II, 73-91; III, 28-111; IV, 6-120. São também mostradas as três cadeias laterais de triptofano (60, 104, 118).

Funções biológicas: a α-LA, como a maioria dos componentes do leite, é sintetizada nas glândulas mamárias. Nas condições fisiológicas, a α-LA funciona como uma proteína "modificadora" da especificidade da enzima D-glicose 4-β-galactosil transferase (EC 2.4.2.33), que é responsável pela síntese da lactose nas glândulas mamárias.

Na ausência de α-LA, a enzima galactosil transferase transfere galactose, preferencialmente, da UDP-galactose para a N-acetilglicosaminil-glicoproteína, mesmo na presença de glicose, uma vez que a transferência da galactose para a glicose é lenta (Km = 1.400 mM). Na presença de α-LA, a transferência de galactose para a glicose é rápida (Km = 5 mM), tornando a glicose o substrato preferencial da enzima (EBNER & MCKENZIE, 1972). Teoricamente, a reação ocorre por dois mecanismos:

(a) ausência de α-LA

UDP – gal + N-acetilglicosaminil-glicoproteína

Mn^{++} ↓ Galactosil transferase

Gal - β - (1 → 4) N-acetilglicosaminil – proteína + UDP

(b) presença de α-LA

UDP – galactose + glicose

↓ Galactosil transferase, α-LA, Mn^{++}

Lactose + UDP

Recentemente (MATSUMOTO *et al.*, 2001) demonstrou-se que a α-LA desempenha função importante na prevenção de úlcera gástrica causada por etanol absoluto e por estresse, em ratos. Foi sugerido que esta função seja exercida por meio do estímulo à produção de prostaglandinas. EUGENE e BERLINER (2000) citam uma série de trabalhos recentemente realizados por autores suecos, mostrando que a α-LA humana, em condições específicas de pH e na presença de ácido oléico polimeriza-se e adquire a propriedade de apoptose (capaz de destruir células cancerígenas de várias linhagens e células jovens não diferenciadas), não tendo nenhuma ação sobre células adultas normais.

Albumina de soro bovino (BSA): foi cristalizada a partir do leite bovino apresentando composição e propriedades físicas semelhantes às da albumina do soro de sangue bovino (POLIS *et al.*, 1950). A BSA tem conformação nativa globular, solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica com cerca de 580 resíduos de aminoácidos e apresenta peso molecular 66,2 kDa e pI a pH 4,7-4,8. Em pH abaixo do pI apresenta alterações em suas propriedades físicas e químicas, como aumento da viscosidade intrínseca, volume molecular e redução acentuada de solubilidade em 3 M de KCl. Sua estrutura secundária é formada de 54% α-hélice, 40% de estruturas β (folhas e giros β) com três domínios específicos para ligação de íons metálicos, de lipídios e de nucleotídios, respectivamente. A quantidade de estrutura em α-hélice varia com o pH, de 54 a 44 e 35% nos pHs 3,6, 3,9 e 2,7, respectivamente.

A BSA passa para o leite através do sistema vascular, por uma rota semelhante à das imunoglobulinas, e está presente em elevada concentração em leite de vaca com mastite. Em condições normais, o leite de vaca contém 0,7 a 1,3% de BSA, o que representa cerca de 15 a 20% do conteúdo protéico do soro de leite.

Duas características estruturais importantes da BSA são a presença de um grupo sulfidrilo livre (res 34) do peptídio N-terminal e a existência de 17 pontes dissulfeto na molécula. O rompimento dessas ligações resulta em modificações de algumas de suas propriedades físicas e estruturais, em especial do perfil de sedimentação na ultracentrifugação, das propriedades imunológicas e do perfil de solubilidade em função do pH. No estado nativo apresenta elevada solubilidade na faixa de pH 1,5-

8,0; quando as ligações dissulfeto são rompidas aparece uma região de solubilidade mínima entre pH 3,5-5,0 que se amplia com o aumento do número de ligações rompidas.

Lactoferrina: é uma glicoproteína que liga fortemente dois moles de ferro por mole de proteína (86,1 kDa), apresentando-se com uma cor salmão-vermelha, quando em solução. Sem o ferro ligado à apolactoferrina em solução, apresenta-se incolor. É uma proteína básica com pI em torno de pH 8. Seu comportamento eletroforético é heterogêneo tanto em géis alcalinos como ácidos, provavelmente em razão de sua forte tendência de formar produtos de interação. Com o ferro ligado, apresenta resistência ao calor e à ação química ou enzimática.

A descrição que se segue refere-se particularmente à lactoferrina do leite humano (LfH) em razão de escassas informações para a lactoferrina bovina (LfB). A completa seqüência de aminoácidos da LfH revelou duas metades homólogas e 691 resíduos de aminoácidos, cada uma com um único sítio de ligação de Fe^{+3} e um único sítio de glicosilação (METZ-BOUTIGNE *et al.*, 1984; METZ-BOUTIGNE *et al.*, 1981). O peso molecular calculado, 82.400 ± 400 Da, inclui a parte carboidrática da molécula. A remoção da porção glicídica resulta em perda da capacidade de ligação de Fe^{+3}. A comparação da seqüência das duas metades da molécula mostra 125 resíduos de aminoácidos idênticos. A estrutura terceária apresenta, em cada metade, dois lobos, lobo N (metade N-terminal, res 1 a 333) e lobo C (metade C-terminal, res 345 a 691), conectados por três giros em α-hélice (res 334 a 344). Os dois lobos são superponíveis por meio de um giro de 180,4° e uma translação de 25,2 angstroms. A interação entre os dois lobos envolve um agrupamento de cadeias hidrofóbicas. Cada um dos lobos é subdividido em dois domínios idênticos: lobo N domínio 1, resíduos 1 a 90 e 252 a 320; lobo N domínio 2, resíduos 434 a 595. Os domínios exibem estruturas α/β similares; uma folha β central formada de 5 a 6 filamentos β paralelos, conectada por hélices percorrendo em direção antiparalela, conforme desenho esquemático da Figura 10.

O sítio de ligação para o ferro está localizado na cavidade existente entre os domínios 1 e 2 de cada lobo. O sítio de Fe no lobo C aparece em ambiente mais fechado, conseqüentemente o Fe do sítio do lobo C é comparativamente mais estável.

O microambiente em que se encontram os sítios de ligação do Fe é predominantemente polar. Cada átomo de ferro liga-se, por coordenação, a dois oxigênios fenólicos da tirosina (lobo N, Tyr 92 e 192; lobo C, Tyr 435 e 528), uma His imidazólica (lobo N, His 253; lobo C, His 597), um oxigênio carboxílico do aspartato (lobo N, Asp 60; lobo C, Asp 395).

O resíduo de aspartato forma também pontes de H com grupos N-H de resíduos da cadeia principal. Os quatro ligantes de natureza protéica pertencem aos domínios 1 e 2 e às cadeias principais da molécula, e provavelmente desempenham um papel importante na estabilidade estrutural do sítio de ligação de Fe^{+3}. O íon bicarbonato liga-se ao ferro como um ligante bidentado que é também ligado por pontes de hidrogênio à arginina-121 e ao N-H da cadeia principal (res 123), todos localizados na hélice-5. A essencialidade da His, Trp, Asp e Arg na ligação do Fe^{+3} foi extensivamente estudada e confirmada por grande número de modificações químicas (FEENEY *et al.*, 1983).

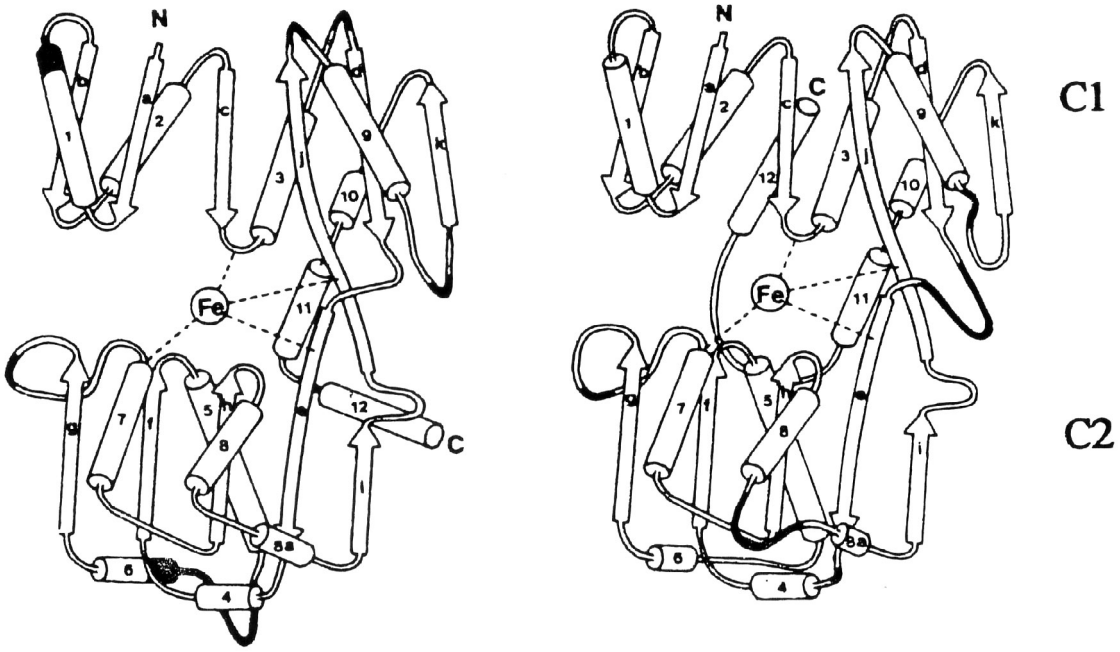

FIGURA 10. Estrutura terceária da lactoferrina humana constituída de duas metades similares, mostrando o sítio de ligação do ferro (Fe). As representações em cilindro mostram estruturas em α-hélice e as estruturas em fita indicam estruturas em folhas β.

Função biológica: entre as funções biológicas da lactoferrina está a capacidade de fixação de Fe^{+3}. Em virtude de sua habilidade de quelar o Fe^{+3}, exerce atividade bacteriostática contra organismos patogênicos Fe-dependentes do leite, bem como no intestino de animais que ingerem o leite.

Em nível intestinal, a lactoferrina exerce ainda função imunoestimulatória e age como fator de crescimento e maturação dos enterócitos (MCINTOSH *et al.*, 1998).

Imunoglobulinas: as imunoglobulinas constituem uma família de proteínas de elevado peso molecular e que apresentam propriedades físicas, químicas e imunológicas diversas. As imunoglobulinas ocorrem no soro sanguíneo e em outros fluidos corporais. Aparecem em elevada concentração no colostro e servem para transmitir imunidade passiva aos recém-nascidos. Todas as imunoglobulinas são monômeros ou polímeros formados de unidades de quatro cadeias polipetídicas: duas cadeias curtas (~20 kDa) e duas cadeias longas (50-70 kDa), ligadas por pontes dissulfeto. Três classes de imunoglobulinas (Ig) foram identificadas em bovinos: IgG (G_1 e G_2), IgA e IgM. Todas são encontradas no soro sanguíneo e no leite bovino (BUNNER, 1977).

IgG_1 e IgG_2: no soro sanguíneo de bovino, essas duas imunolgobulinas ocorrem em igual proporção e em concentração relativamente elevada, comparada com a do leite. A IgG_1 é a que se apresenta em maior concentração no leite e parece ser transportada seletivamente do soro sanguíneo para o leite. No colostro, a concentração de IgG_1 é bastante alta, representando a metade das proteínas totais do soro. A IgG_2 está presente tanto no colostro como no leite em concentração mais baixa. As IgG existem essencialmente como monômeros, contendo na molécula 2-4% de carboidrato e PM ~160 kDa.

IgA: esta imunoglobulina apresenta propriedades antigênicas distintas das Igs G e M. A IgA do leite difere da do soro sanguíneo por aparecer ligada a uma glicoproteína e é reconhecida como fator secretor livre (FSL). O FSL aparece também como uma glicoproteína do leite e esta foi identificada como glicoproteína-a. A IgA apresenta-se como dímero com PM ~400 kDa, contendo 8-9% de carboidrato.

IgM: é uma macroglobulina que ocorre no leite em concentrações relativamente baixas, sendo provavelmente homóloga à IgM de outras espécies. Aparece na forma de pentâmero (PM ~900 kDa), contendo 12% de carboidrato.

Um desenho esquemático de uma imunoglobulina (monômero) é apresentado na Figura 11.

4. PRINCIPAIS ENZIMAS DO LEITE

O leite é um produto muito rico em enzimas, com mais de 50 enzimas já descritas e estudadas. Cerca de metade dessas enzimas encontram-se associadas à membrana dos glóbulos de gordura (MGG) ao passo que outras se encontram no leite desnatado associadas às caseínas, mas, principalmente, como proteínas do soro de leite. Faremos menção apenas a algumas das enzimas de maior interesse tecnológico (BUNNER, 1977).

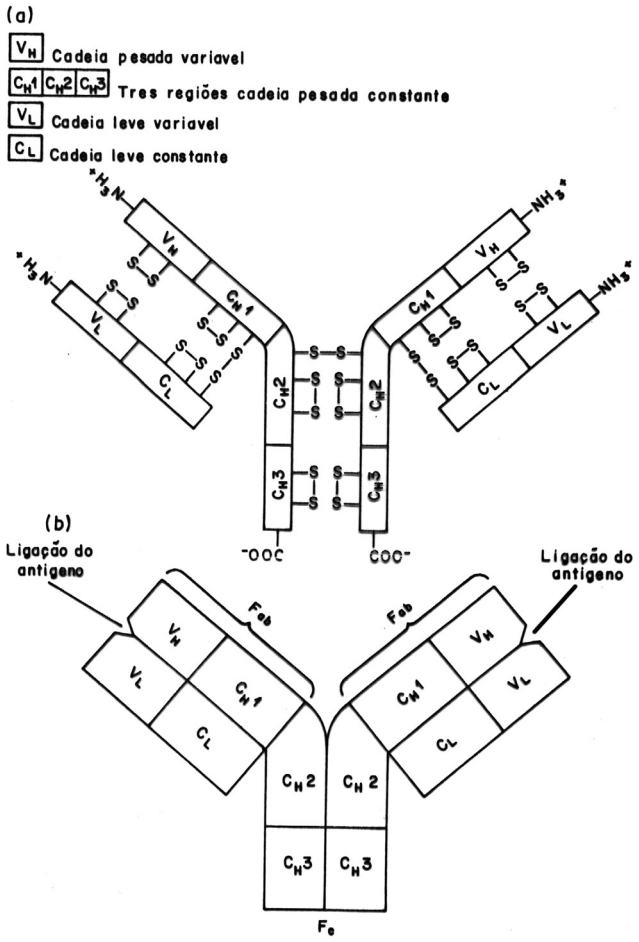

FIGURA 11. Desenho esquemático das imunoglobulinas mostrando as quatro cadeias polipeptídicas em paralelo (2 leves e 2 pesadas), destacando ainda: ligações dissulfeto (3 intercadeias e 12 intracadeias); regiões variáveis (V) e regiões constantes (C); sítio de ligação de antígenos.

Fosfatase alcalina: essa enzima existe como um complexo lipoprotéico e é distribuída entre a membrana dos glóbulos de gordura (MGG) e a fase aquosa. Sua atividade é de hidrólise dos fosfomonoésteres e requer Mg^{++} como co-fator e um pH em torno de 9,0. Em determinadas condições, pode catalisar a desfosforilação das caseínas, porém a uma velocidade muito reduzida. Sua inativação térmica ocorre a 71,5 °C por 16s, servindo como um dos indicadores na pasteurização do leite. Contudo, em alguns casos, essa enzima é reativada no leite processado, em condições de estocagem acima de 5 °C.

Lipases: o leite contém lipases que, em determinadas condições, hidrolizam a gordura produzindo sabor amargo e à ranço. Embora a lipólise possa ocorrer nas condições de pH do leite, 6,6 a 6,7, o máximo de atividade lipolítica ocorre a pH em torno de 9,0. Alguns pesquisadores notaram que a lipase se encontra associada às micelas de caseína e que, em grande parte, passa para o soro, pela adição de NaCl (DOWNEY & ANDREWS, 1965a; DOWNEY & ANDREWS, 1965b). Quando a caseína micelar foi cromatografada em Sephadex G-200, três zonas com atividade lipolítica foram detectadas na faixa de PM

62 a 132 kDa. As lipases são bastante sensíveis à presença de metais pesados, ao calor e à luz, sendo inativadas pela pasteurização do leite.

Proteases: uma enzima proteolítica de origem endógena, semelhante à tripsina, é encontrada no leite, em associação com a caseína. Essa enzima tem sido extraída da caseína precipitada por ácidos e parece estar preferencialmente associada com a caseína κ. Apresenta um largo espectro de pH ótimo (pH 6,5 – 9,0). A caseína β é mais suscetível à hidrólise, seguida da α_{s1} e das caseínas κ. Provavelmente esse é o mecanismo responsável pela formação de caseínas γ, a partir das caseínas β. No seu estado livre, essa enzima é inativada pelo tratamento a 80 °C, 10 min, contudo no leite sua resistência térmica pode ser maior. Sua sobrevivência durante o processamento do leite e na cura dos queijos poderá ser de importância para a estabilidade e a qualidade do produto.

Oxidase das xantinas: essa enzima catalisa a oxidação de purinas, hipoxantina e xantina a ácido úrico. É encontrada em concentração elevada na MGG representando cerca de 10% das proteínas dessa estrutura láctea. Seu peso molecular é de ~300 kDa e liga-se firmemente ao co-fator FAD (flavina adenina dinucleotídeo), molibdênio e ferro na proporção de 2: 2:8. Foi demonstrado (WAUD *et al.*, 1975) que o PM de 300 kDa representa um dímero com duas subunidades idênticas.

Oxidase sulfidrílica: essa enzima catalisa a oxidação de grupos sulfidrilos a dissulfeto. Isolada do soro de leite, apresenta o fenômeno de dissociação – associação. Em PAGE-SDS revelou uma zona (monômero) de PM 89 kDa (JAMBINO & SWAISGOOD, 1975). Essa enzima, na forma imobilizada, tem aplicação industrial na eliminação do gosto estranho de leites superaquecidos, refazendo as pontes dissulfeto a partir de grupos –SH livres.

Lactoperoxidase: representa de 0,5 a 1,0% do total das proteínas do soro de leite. Catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio, na presença de um doador de hidrogênio ou de um componente oxidável. Trata-se de uma hemoproteína com PM de 77 kDa. Funciona no leite como um inibidor de bactérias, particularmente de *Salmonella* e *Streptococcus* patogênicos, na presença de peróxido e tiocianato, ambos presentes no leite. A lactoperoxidase é também um bom indicador da correta pasteurização, pois sua atividade deve permanecer, em boa parte, após pasteurização adequada do leite.

5. CONCLUSÃO

Apesar de as proteínas do leite serem talvez, entre as proteínas alimentícias, as mais estudadas, ainda existem aspectos fundamentais relativos às estruturas e às relações estruturas-funções, tanto das caseínas como das proteínas do soro, não totalmente compreendidos. A falta de um conhecimento mais completo das diferentes estruturas, de como essas estruturas se alteram em diferentes condições de acidez (pH) de concentrações salinas (força iônica) e de temperatura, torna difícil a interpretação de como as proteínas do leite interagem entre si e com outras espécies moleculares que compõem os alimentos e, dessa forma, dificulta explicar as variações observadas em suas propriedades físicas, tecnológicas, nutritivas e fisiológicas, em razão dos vários fatores presentes no processamento, no armazenamento e na distribuição dos alimentos para o consumo.

Essas dificuldades explicam e justificam o continuado interesse no estudo das propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOTELHO, M.; VALENTE-MESQUITA, V.L.; OLIVEIRA, K.M.G.; POLIKARPOV, I.; FERREIRA, S.T. Pressure denaturation of β-lactoglobulin. Different stabilities of isoforms A and B, and an investigation of the Tenford transition. **Eur. J. Biochem.**, 267: 2.235-2.241, 2000.

BOUNOUS, G.; KONGSHAVN, P.A.L.; TAVEROFF, A.; GOLD, P. Evolutionary traits in human milk proteins. **Medical Hypothesis**, 27:133-140, 1988.

BREW, K.; VANAMAN, T.C.; HILL, R.L. The role of α-LA and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction. **Proc. Natl. Acad. of Sci.**, USA, 59:491-497, 1968.

BROWNE, W.J.; NORTH, A.C.T.; PHILLIPS, D.C. A possible three-dimentional structure of bovine α-lactalbumin based on that of hen's egg-white lysozyme. **J. Mol. Biol.**, 42:65-86, 1969.

BROWNLOW, S.; MORAES CABRAL, J.H.; COUPER, R.; FLOWER, D.R.; YEWDALL, S.J.; POLIKARPOV, I.; NORTH, A.C.T.; SAWYER, L. Bovine β-lactoglobulin at 1.8 A resolution-still an enigmatic lipocalin. **Structure,** 5:481-495, 1997.

BUNNER, J.R. Milk proteins. In: WHITAKER, J.R.; TANNENBAUM, S.R. (Eds.). **Food proteins.** AVI Publishers Company, Inc., 1977. 602 p., p.175-208.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas aimentárias**. Zaragoza: Editora Acribia, 1989. 346 p.

DAI-DONG, J.X.; NOVAK, G.; HARDY, J. Stabilization of vitamin C by β-lactoglobulin during heat treatment. **Science des Aliments**, 10: 393, 1990.

DOWNEY, W.K.; ANDREWS, P. Gel filtration applied to study of lipase and other esterases. **Biochem. J.**, 94:642-650, 1965a.

DOWNEY, W.K.; ANDREWS, P. Milk lipases and the association of lipases with casein micelles studied by gel filtration. **Biochem. J.**, 94:33, 1965b.

EBNER, K.E.; MCKENZIE, L.M. α-lactalbumin and galactosyl transferase in rat serum and their relationship to milk secretion. B**iochem. Biophys, Res. Commun**., 49:1.624-1.630, 1972.

EUGENE, A.; BERLINER, L.J. α-lactalbumin: structure and function. **FEBS Letters**, 473(3): 269-274, 2000.

FEENEY, R.E.; OSUGA, D.T.; MEARES, C.F.; BABIN, D.R.; PENNER, M.H. Studies on iron-binding sites of transferrin by chemical modification. In: **Structure and function of iron storage and transport proteins**. I. URUSHIZAKI *et al.*; (Ed). Elsevier Science, 1983.

FUGATE, R.D.; SONG, P. Spectroscopic characterization of β-lactoglobulin-retinol complex. **Biochem. Bioph.** Acta, 625:28, 1980.

HÄUSEL, R.; BRÜCHNER, H.; REIMERDES, E.H. Cross-flow microfiltration in the dairy industry: principles, technology and applications. **Lebensmitteltechnic,** 22:652-659, 1990.

IAMETTI, S.; DE GREGORI, B.; VECCHIO, G.; BONOMI, F. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β-lactoglobulin. **Eur. J. Biochem.**, 237:106-112, 1996.

JAMBINO, V.G.; SWAISGOOD, H.E. Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase. **J. Biol. Chem.**, 250:2532-2538, 1975.

JANG, H.; SWAISGOOD, H. Analysis of ligand binding and β-lactoglobulin denaturation by chromatography on immobilized trans-retinal. **J. Dairy Sci.**, 73:2067-2074, 1990.

LANGE, D.C.; KOTHARI, R.; PATEL, R.; PATEL, S.C. Retinol and retinoic acid bind to a surface cleft in bovine β-lactoglobulin: a method of binding site determination using fluorescence resonance energy transfer. **Biophysical Chem.**, 74:45-51, 1998.

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos.** Jaboticabal, São Paulo: Edição Funep, 2000. capítulo 5, p.179-231.

MATSUMOTO, H.; SHIMOKAWA, Y.; ISHIDA, Y.; TOIDA, T.; HAYASAWA, H. New biological function of bovine α-lactalbumin: protective effect against ethanol and stress-induced gastric mucosa injury in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 65:1.104-1.111, 2001.

MCINTOSH, G.H.; ROYLE, P.J.; LELEU, R.K.; REGISTER, G.O.; JOHNSON, M.A.; GRINSTED, R.L.; KENWARD, R.S.; SMITHERS, G.W. Whey protein as functional ingredients. **Int. Dairy J.**, 8:423-434, 1998.

METZ-BOUTIGNE, M.H.; MAZURIER, J.; JOLLES, J.; SPIK, G.; MONTREUIL, J.; JOLLES, P. The present state of the human lactotransferrin sequence. Study and alignment of the cyanogen bromide fragments and characterization of N- and C-terminal domains. **Biochim. Biophys. Acta**, 670:243-254, 1981.

METZ-BOUTIGNE, M.H.; JOLLES, J.; MAZURIER, J.; SCHOENTGEN, F.; LEGRAND, D.; SPIK, G.; MONTREUIL, J.; JOLLES, P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. **Eur. J. Niochem.**, 145:659-676, 1984.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). Food proteins: processing applications. Wiley-VCH, Inc., 2000. p.1-21.

MONACO, H.L.; ZANOTTI, G.; SPADON, P.; BOLOGNESI, M.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E.E. Crystal structure of the trigonal form of bovine β-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 A resolution. **J. Mol. Biol.**, 197:695-706, 1987.

MORR, C.V.; FOEGEDING, E.A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. **Food Technology**, 44:100-112, 1990.

NAGOKA, S.; FUTAMURA, Y.; MIWA, K.; AWANO, T.; YAMAUCHI, K.; KANAMARU, T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β-lactoglobulin. **Bioph. Biochem. Res. Comm.**, 281:11-17, 2001.

PALAZOLO, G.; RODRIGUEZ, F.; FARRUGIA, B.; PICO, G.; DELORENZI, N. Heat treatment of β-lactoglobulin: structural changes studies by partitioning and fluorescensce. **J. Agr. Food Chem.**, 48:3.817-3.822, 2000.

PANICK, G.; MALESSA, R.; WINTER, R. Differences between the pressure and temperature-induced denaturation and aggregation of β-lactoglobulin A, B, and AB monitored by FT-IR spectroscopy and small angle X-ray scattering. **Biochemistry**, 38:6.512-6.519, 1999.

PAPIZ, M.Z.; SAWYER, L.; ELIOPOULOS, E.E.; NORTH, A.A.C.T.; FINLAY, J.B.C.; SIVAPRASADARAO, R.; JONES, T.A.; NEWCOMER, M.E.; KRAULIS, P.J. The structure of β–lactoglobulin and its similarity to plasma and retinol-binding protein. **Nature**, 324:383-385, 1986.

PHOTCHANACHAI, S.; KITABATAKE, N. Heating of β-lactoglobulin. A solution in a closed system at high temperatures. **J. Food Science**, 66:647-652, 2001.

POLIS, B.D.; SHMUKLER, H.W.; CUSTER, J.H. Isolation of a crystalline albumin from milk. **J. Biol. Chem.**, 187:349-354, 1950.

RENNER, E.; EL-SALAM, M.H.A. **The application of ultrafiltration in the dairy industry**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1991.

ROLLEMA, H.S. Casein association and micelle formation. In: FOX, P.F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry – 1.** Proteins. London: Elsevier Applied Science, 1992. p.61-86.

ROUVINEN, J.; RAUTIAINEN, J.; VIRTANEN, T.; ZEILER, T.; KAUPINEN, J.; TAIVAINEN, A.; MÄNTYJÄRVI, R. Probing the molecular basis of allergy. Three-dimentional structure of the bovine lipocalin allergen Nos d2. **The J. Biological Chem.**, 274, 2.337-2.343, 1999.

SAWYER, L.; KONTOPIDIS, G. The core lipocalin, bovine β-lactoglobulin. **Biochim. Bioph. Acta**, 1.482:136-148, 2000.

SCHMIDT, D.G. Colloidal aspects of casein. Neth. **Milk Dairy J.**, 34: 42-64, 1980.

SEGAWA, T.; SUGAI, S. Interactions of divalent metal ions with bovine, human, and goat α-lactalbumin. **J. Biochem.**, 93:1.321-1.328, 1983.

SÉLO, I.; CLÉMENT, G.; BERNARD, H.; CHATEL, J-M.; CRÉMINON, C.; PELTRE, G.; WAL, J-M. Allergy to bovine β-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. **Clin. Exp. Allergy**, 29: 1.055-1.063, 1999.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos:** propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. 517 p., p.139-157.

STUART, D.I.; ACHARYA, K.R.; WALKER, N.P.C.; SMITH, S.G.; LEWIS, M.; PHILLIPS, D.C. α-lactalbumin possesses a novel calcium binding loop. **Nature**, 324:84-87, 1986.

SWAISGOOD, H.E. Chemistry of milk proteins. In: FOX, P.F. (Ed.). **Developments in dairy chemistry**. I. Proteins. New York: pp.1-60, Applied Sciences Publishers, 1982. p. 1-60.

TAULIER, N.; CHALIKIAN, T. Characterization of pH-induced transtitions of β-LG: ultrassonic, densitometric, and spectroscopy studies. **J. Mol. Biol.**, 14:873-889, 2001.

VANAMAN, T.C.; BREW, K.; HILL, R.L. The disulfide bonds of bovine α-lactalbumin. **J. Biol. Chem.**, 245:4.583-4.590, 1970.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **Intern. Dairy J.**, 9: 189-192, 1999.

WARME, R.K.; MOMANY, F.A.; RUMBELL, S.V.; TUTTLE, R.W.; SCHERAGA, H.A. Computation of structures of homologous proteins. α-lactalbumin from lysozyme. **Biochemistry**, 13:768-781, 1974.

WAUD, W.R.; BRADY, F.O.; WILEY, R.D.; RAJAGOPALAN, K.V. A new purification procedure for bovine xanthine oxidase. Effect of proteolysis on the submit structure. **Arch. Biochem. Biophys.**, 169:695-701, 1975.

WONG, D.W.S.; CARMIRAND, W.M.; PAVLAT, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.** 36(8): 807-844, 1996.

YANG, J.; DUNKER, A.K.; POWERS, J.R.; CLARK, S.; SWANSON, B.G. Beta-lactoglobulin molten globule induced by high pressure. **J. Agr. Food Chem.**, 49:3.236-3.243, 2001.

ZINSLY, P.F.; SGARBIERI, V.C.; DIAS, N.F.G.P.; JACOBUCCI, H.B.; PACHECO, M.T.B.; BALDINI, V.L.S. Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. Braz. **J. Food Technol.**, Campinas, 4:1-8, 2001.