



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Área de Concentração: Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos



**PERFIL PROTEÔMICO, QUÍMICO E ESTRUTURAL DE LEITE EM PÓ DE  
BÚFALA PRODUZIDO EM MINI SPRAY DRYER**

**MARÍLIA VIANA BORGES**

**ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL**

**2016**

**MARÍLIA VIANA BORGES**

**PERFIL PROTEÔMICO, QUÍMICO E ESTRUTURAL DE LEITE EM PÓ DE  
BÚFALA PRODUZIDO EM MINI SPRAY DRYER**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup> DSc<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**Co-orientador:** Prof. DSc. Modesto Antônio Chaves

Prof. DSc. Antônio Silvío do Egito

**ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
2016**

<p>637.1 B733p</p>	<p>Borges, Marília Viana</p> <p>Perfil proteômico, químico e estrutural de leite em pó de búfala produzido em mini spray dryer. / Marília Viana Borges. - Itapetinga: UESB, 2016.</p> <p>65p.</p> <p>Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”. Sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão e co-orientação do Prof. D.Sc. Modesto Antônio Chaves e Prof. Antônio Silvío do Egito.</p> <p>1. Búfala – leite em pó integral - Spray dryer. 2. Leite de búfala - Microscopia. 3. Leite de búfala – Eletroforese. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. III. Chaves, Modesto Antônio. IV. Egito, Antônio Silvío do. V. Título.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD(21): 637.1</b></p>
------------------------	---

**Catálogo na fonte:**

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Búfala – leite em pó integral - Spray dryer
2. Leite de búfala - Microscopia
3. Leite de búfala – Eletroforese



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Programa de Pós-Graduação  
**Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** PERFIL PROTEÔMICO, QUÍMICO E ESTRUTURAL DE LEITE EM PÓ DE BÚFALA PRODUZIDO EM MINI SPRAY DRYER.

**Autor (a):** MARÍLIA VIANA BORGES

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>o</sup> Dr. Modesto Antônio Chaves  
Prof.<sup>o</sup> Dr. Antônio Silvio do Egito

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sibelli Passini Barbosa Ferrão (UESB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gabrielle Cardoso Reis Fontan (UESB)

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Freire de Andrade Morais Penna (UFMG)

**Itapetinga-BA, 16 de fevereiro de 2016.**

*“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”*

*Clarisse Lispector*

*À Deus  
Aos meus pais  
Aos meus irmãos  
À Eduardo*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

*Á Deus, pela sua força divina de me guiar e fortalecer em todos os meus dias, pois sem ele eu não seria nada.*

*Aos meus pais Rosalvo e Marinalva, pelo amor, carinho e confiança. Eles são o meu porto seguro, sempre acreditaram na minha capacidade e me incentivaram.*

*As minhas irmãs Marina e Mônica que mesmo longe sei que posso contar com o apoio, carinho e amizade, são as melhores irmãs do mundo.*

*Ao meu namorado Eduardo, pelo amor e companheirismo, sempre me anima e incentiva e nunca me deixou duvidar da minha capacidade.*

*A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.*

*A professora Dr<sup>a</sup>. Sibelli Passini Barbosa Ferrão, pela pessoa, pois também sempre me incentivou a seguir em frente e acreditar que posso e pela orientação, por estar sempre disponível para passar todo seu conhecimento.*

*Aos professores Dr. Antônio Silvio do Egito e Dr. Modesto Antônio Chaves pela co-orientação contribuindo para ampliar meus conhecimentos e enriquecer esta pesquisa.*

*Ao professor Sergio Fernandes por sua disponibilidade e auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa.*

*As professoras Gabrielle Cardoso Reis Fontan e Cláudia Freire de Andrade Morais Penna, integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite e assim poderem contribuir com esse trabalho.*

*A Mariana por ser minha amiga e companheira durante a realização de toda pesquisa, sem deixar de lembrar de Daniele que sabia que sempre podia contar com a ajuda mesmo quando não precisava.*

*Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UESC pela disponibilidade para a realização da análise de MEV, principalmente ao professor Gross por ter disponibilizado o equipamento e a Lucas, Wagner e Larissa que me acompanharam em cada análise e se tornaram meus amigos.*

*A Vale Dourado por disponibilizar o laboratório para a realização das análises de qualidade do leite em pó, principalmente a Marcos, Leo e Jaiane.*

*Ao Grupo de Estudos em Leite (GEL).*

*Aos colegas do mestrado, em especial Mylena e Mariana, minhas eternas amigas, pessoinhas que estão presentes em minha vida desde a graduação e que seguem comigo nesta mesma caminhada.*

*À Capes pela concessão da bolsa.*

*Ao Laticínio Gostoso e Pytty, por disponibilizar o leite para a realização do experimento.*

*A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desta história.*

*Meus sinceros agradecimentos.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias obtidas por MEV das amostras de leite em pó búfala. A = aproximação de 1000x; B = aproximação de 3000x; C = aproximação de 20000x. Análises realizadas durante o tempo de armazenamento 1= tempo 0; 2= tempo 30; 3= tempo 60; 4=tempo 90; 5= tempo120 e 6= tempo 150. ....31

Figura 2. Fotomicrografias obtidas por MEV contendo o tamanho das partículas de leite em pó búfala. A, B, C, D, E e F correspondem a 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de estocagem respectivamente. ....33

Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das amostras de leite em pó de búfala. Gel revelado com Azul de Comassie (a); gel corado com Nitrato de Prata (b). Depositaram-se 20 µg de proteínas em cada poço. PM, Marcador de massa molar; amostras nos tempos de análise (0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento);  $\alpha_s$ -CN,  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN,  $\beta$ -caseína; k-CN. ....33

Figura 4. Densitometria dos resultados obtidos por meio da eletroforese SDS-PAGE para os géis corados com Azul de Comassie (A) e Nitrato de Prata (B). (1º pico)  $\alpha$ -caseína; (2º pico)  $\beta$ -caseína; (3º pico)  $\kappa$ -caseína; (4º,5º,6º e 7º pico) peptídeos formados pela degradação das frações proteicas; tempos de armazenamento (T0, T30, T60, T90, T120 e T150). ....36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes do gel de separação .....	21
Tabela 2. Componentes do gel de concentração/empilhamento.....	21
Tabela 3. Médias±desvio padrão da Composição do leite de búfala in natura .....	24
Tabela 4. Médias dos parâmetros do leite em pó de búfala de acordo ao tempo de armazenamento .....	27
Tabela 5. Valores das áreas dos picos encontrados pela densitometria e peso molecular de cada fração proteica identificada na eletroforese SDS-PAGE .....	37

## LISTA DE SIMBOLOS

$\alpha$  alfa

$\alpha$ s-CN alfa s-caseína

$\beta$  beta

$\beta$ -CN beta-caseína

°C grau Celsius

°D grau Dornic

° indicativo de ordem

$\kappa$  kapa

$\kappa$ -CN kapa-caseína

kDa quiloDalton

L litro

m massa

< menor

$\mu$ L microlitro

mA miliampere

mg miligrama

mL mililitro

nm nanometro

n° número

% porcentagem

rpm rotação por minuto

V voltz

v volume

## **LISTAS DE SIGLAS**

ABCB Associação Brasileira de Criadores de Búfalos

ANOVA Análise de Variância Univariada

BA Bahia

CEDETEC Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias

CN Caseína

DIC Delineamento Inteiramente Casualizado

ESD Extrato seco desengordurado

EST Extrato seco total

FAO Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

IAL Instituto Adolfo Lutz

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

PM Marcador de massa molecular

P probabilidade

PAGE Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida em Dodecil Sulfato de Sódio

UESB Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
SUMMARY .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Bubalinocultura: Aspectos Gerais e a produção leiteira.....	5
2.2. Características gerais do leite de búfala.....	6
2.3. Leite em pó: definição, produção e mercado .....	7
2.4. Propriedades físicas e químicas do leite em pó .....	9
2.5. Secagem do leite em spray dryer .....	10
2.6. Microscopia Eletrônica .....	13
2.7. Estudos proteômicos .....	14
2.7.1. Eletroforese desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	15
3. OBJETIVOS .....	17
3.1. Objetivo geral .....	17
3.2. Objetivo específico .....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1. Produção do leite em pó.....	18
4.3. Avaliação da qualidade físico-química do leite em pó.....	19
4.3.1. Análises da composição do leite em pó.....	19
4.3.1.1. Análise eletroforética SDS-PAGE do leite em pó .....	20
4.3.1.1.2. Análise do perfil eletroforético .....	20
4.3.1.1.3. Método SDS-PAGE .....	20
4.3.1.1.4. Preparação dos géis .....	20
4.3.1.1.5. Corrida eletroforética .....	21
4.3.1.1.6. Fixação das proteínas .....	22
4.3.2. Densitometria das frações proteicas .....	22
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura .....	22
4.4. Planejamento Experimental .....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24

5.1. Análise do leite de búfala in natura .....	24
5.2. Obtenção do leite em pó de búfala e seus parâmetros de qualidade .....	25
5.3. Análise de microscopia eletrônica de varredura .....	29
5.4. Análise eletroforética .....	33
CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	39

## RESUMO

**BORGES, M. V. Perfil proteômico, químico e estrutural de leite em pó de búfala produzido em mini spray dryer.** Itapetinga – BA: UESB, 2016. 60p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

A utilização de leite de búfala para a obtenção de leite em pó se destaca não só pelo aumento no tempo de armazenamento, mas também pelo seu alto valor nutricional. Objetivou-se com o presente trabalho obter leite em pó integral de búfala por meio de secagem em mini spray dryer e avaliar características físicas, químicas, estruturais e proteômicas durante seu armazenamento. O leite de búfala foi submetido à secagem por atomização, em mini spray dryer, com temperatura do ar na entrada e saída do secador de 140°C e 80°C, respectivamente, bico injetor de 1,0 mm de espessura com vazão de ar de 40 L/min, vazão do ar de secagem 3 m<sup>3</sup>/min e vazão da bomba de 1,07 L/h. As amostras obtidas foram embaladas a vácuo em embalagens flexíveis laminadas e avaliadas no tempo zero e aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Foram analisados os teores de umidade, gordura, proteínas, cinzas, densidade, acidez, índice de solubilidade e partículas queimadas, além da análise estrutural realizada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o estudo proteômico por meio da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A produção do leite em pó a partir dos padrões fixados originou um leite em pó de búfala com teores médios de 34,09% de gordura, 4% de umidade, 11,32°D de acidez, 4,8% de cinzas, 1,04 g/mL de densidade, 21,51% de proteínas, 0,20 mL de índice de solubilidade e 7,5 mg de partículas queimadas (valor correspondente ao disco B). Dentre os parâmetros avaliados, o tempo influenciou apenas na absorção de umidade, pois esta apresentou um aumento significativo durante o armazenamento. Na análise de microscopia foi possível observar uma aglomeração de partículas de leite em pó com estruturas murchas e enrugadas, obtidas provavelmente pela técnica empregada no processo de sua obtenção. Por meio do estudo proteômico, as frações proteicas identificadas não apresentaram alterações significativas durante os 150 dias de estocagem. Diante dos resultados encontrados, torna-se viável a produção de leite em pó de búfala em mini spray dryer, pois o leite apresentou boas características de qualidade que se mantiveram constante durante o tempo de análise.

**Palavras-chave:** microscopia, eletroforese, spray dryer.

---

\*Orientador (a): Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB. Co-orientadores: Modesto Antônio Chaves, DSc., UESB; Antônio Silvio do Egito, DSc., EMBRAPA.

## SUMMARY

BORGES, M. V. **Profile proteomic, chemical and structural buffalo milk powder produced in mini spray dryer**. Itapetinga - BA: UESB, 2016. 60p. (Dissertation - Masters in Engineering and Food Science) \*.

The use of buffalo milk for obtaining milk powder stands out not only for its longer shelf life, but also for its high nutritional value. The goal of this paper was to obtain whole milk powder from buffalo milk by drying in mini spray dryer and evaluate their physical, chemical, structural and proteomic during storage. The buffalo milk was subjected to spray drying in a mini spray dryer, with the air temperature in and 140 ° C and 80 ° C, respectively, out of the dryer, 1.0 mm thick nozzle with 40 L of air flow / min, air drying flow of 3 m<sup>3</sup> / min and pump flow of 1.07 L / h. The samples were vacuum packed in flexible packaging laminate and evaluated at time zero and at 30, 60, 90, 120 and 150 days of storage at room temperature. the moisture content were analyzed, fat, protein, ash, density, acidity, solubility index and burning particles, as well as structural analysis by scanning electron microscopy (SEM) and the study proteomic by denaturing gel electrophoresis poliacrilaminda (SDS-PAGE). The production of milk powder from the set patterns generated a buffalo milk powder with average of 34.09% of fat, 4% moisture, 11,32°D acidity, 4.8% ash, 1.04 g / ml density, 21.51% protein, 0.20 mL solubility index and 7.5 mg of burnt particles (equivalent to the disk B). Among the evaluated parameters, time influenced only in moisture absorption, as this showed a significant increase during storage. In the analysis of microscopy it was possible to observe a milk powder particle agglomeration with wilted structures and wrinkled, probably obtained by the technique employed in the process of obtaining it. Through proteomic study identified protein fractions showed no significant changes during the 150 days of storage. Considering the results, it becomes feasible to milk production in buffalo milk powder mini spray dryer because the milk had good quality characteristics that have remained constant during the analysis time.

**Keywords:** microscopy, electrophoresis, spray dryer.

---

\* Adviser (a): Sibelli Passini Barbosa Stinger, DSc, UESB. Co-advisors: Modesto Antonio Chaves, DSc, UESB; Antônio Silvio do Egito, DSc., EMBRAPA.

## 1. INTRODUÇÃO

A bubalinocultura brasileira vem apresentando elevado crescimento que é evidenciado pelo aumento populacional destes animais em diversas regiões. Este aumento se deve principalmente pela utilização do leite produzido na elaboração de derivados, já que o leite de búfalas apresenta alto teor de seus constituintes como gordura, proteína e lactose, sendo, portanto, mais concentrado, apresentando assim menos água e mais matéria seca. Deste modo, se garante um alto valor nutricional devido às suas características de composição e maior rendimento na produção de seus derivados devido ao seu maior conteúdo de matéria seca, porém a sua utilização no Brasil se limita basicamente para a produção de queijos.

Na busca de se obter um novo produto levando em consideração a sazonalidade na produção do leite de búfala e sua escassez em determinados períodos, torna-se necessário o aprimoramento de técnicas a fim de se garantir um produto seguro e saudável mantendo o seu valor nutricional e conservação por um maior período, para que o mesmo seja comercializado também nos períodos de entre safra, suprimindo a necessidade do consumidor. Assim, o processo de secagem é um dos métodos mais indicados, pois garante a estabilidade tanto microbiológica quanto físico-química permitindo manter as características mínimas de qualidade que o leite deve apresentar para que seja consumido em um prazo de validade mais prolongado.

A secagem promove a remoção de água por meio do contato da gotícula de leite com o ar de secagem, fazendo com que reduza a atividade de água e por consequência aumenta a estabilidade microbiológica e diminui os riscos de degradação, além de facilitar o armazenamento e transporte deste produto. Porém existem fatores que podem contribuir para provocar alterações nas partículas do leite em pó, como elevadas temperaturas, elevada umidade e migração de componentes (gordura, proteína e lactose) para a superfície da partícula durante o período de estocagem, que podem promover aglomeração de partículas, cristalização da lactose, reação de Maillard, oxidação de gorduras e alterações nas propriedades de solubilidade (molhabilidade e dispersabilidade por exemplo).

Visto que alterações podem ocorrer no leite em pó durante a estocagem, a utilização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) torna possível visualizar a superfície da partícula de leite a fim de verificar possíveis alterações na sua estrutura que podem estar associadas a estes fatores.

Outros estudos também podem ser realizados com o intuito de verificar as diferentes frações proteicas presentes em uma amostra. A eletroforese, uma das técnicas mais utilizadas, promove a separação de partículas fazendo com que as mesmas sejam dissolvidas ou

suspensas em um eletrólito, através do qual uma corrente elétrica é aplicada, assim as moléculas ionizadas, em solução, são separadas de acordo com suas cargas elétricas e massas moleculares em campo elétrico.

Não há relatos de produção de leite em pó de búfala em escala comercial no Brasil, e poucos são os trabalhos que avaliam a produção e qualidade deste derivado. Considerando a qualidade nutricional do leite de búfala se torna interessante o desenvolvimento de um novo produto com boas características sensoriais e excelente valor nutricional para que este possa ser comercializado no âmbito nacional. Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho obter leite em pó integral de búfala por meio de secagem em mini spray dryer e avaliar suas características físicas, químicas, estruturais e proteômicas durante seu armazenamento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Bubalinocultura: Aspectos Gerais e a produção leiteira

Os búfalos domésticos pertencem à família *Bovidae*, à subfamília *Bovinae* (mesma classificação dos bovinos) e à espécie *Bubalus bubalis*, sendo distinto do búfalo africano, *Syncerus caffer* e do búfalo americano, *Bison bison* (DAMÉ, 2006). Os búfalos (*Bubalus bubalis*) domésticos são de origem asiática, especialmente da Índia, China e Paquistão. Contudo, já se encontram distribuídos nos continentes africano, americano e europeu (MARQUES, 2000). Os búfalos chegaram oficialmente ao Brasil entre 1890 e 1895 trazidos por condenados foragidos da Guiana Francesa em um barco que ancorou no norte da Ilha do Marajó (SANTIAGO, 2000).

Para Carmo (2006), a espécie *Bubalus bubalis* subdivide-se em três variedades: *fulvus*, *bubalis* e *kerebau*, sendo que apenas duas dessas variedades possuem raças representativas no Brasil, a variedade *bubalis*, conhecida como búfalos de rio (representada pelas raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi) e a variedade *kerebau*, conhecida como búfalos de pântano (representada pela raça Carabao ou Rosilho). Esta mesma subdivisão da espécie *Bubalus bubalis* é reconhecida pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos – ABCB (ABCB, 2012).

A bubalinocultura brasileira vem apresentando elevado crescimento nas últimas décadas, evidenciado pelo aumento populacional desses animais em diversas propriedades e regiões (RODRIGUES et al., 2008). Os búfalos são criados no Brasil principalmente para a produção de carne e leite servindo, ainda, como animal de trabalho e meio de transporte. Isso se dá pelo fato de serem animais que apresentam alta rusticidade, resistência a doenças e adaptabilidade a solos, e apresentarem também a capacidade de produzir proteínas de alto valor (carne e leite) a partir de alimentos fibrosos (OLIVEIRA, 2005; VIEIRA et al., 2011). De acordo com Tonhati (2000), na região norte predominam os bubalinos destinados à produção de carne e na região Sul, a produção de leite é preferida.

O efetivo bubalino mundial é de 195.266.000 cabeças, sendo que cerca de 189 milhões se encontram na Ásia (97%), com destaque para a Índia com cerca de 113 milhões de animais (60%) (FAO, 2013). O efetivo bubalino nacional foi de 1.261.922 cabeças em 2012 tendo um aumento de 104,56% deste período para 2014 onde apresentou um total de 1.319.478 cabeças. Desse total, o Pará possuiu a maior representatividade com 493.646 búfalos e a Bahia nesse mesmo período apresentou 25.128 búfalos, ficando em 11º lugar no ranking (IBGE, 2015).

Com o crescimento na população de animais ocorre, conseqüentemente, um crescimento na produção leiteira. Segundo Jorge et al. (2011), nos últimos cinquenta anos, o crescimento da produção de leite de búfala no Brasil foi de 301,0%, diferente do leite de vaca, que nesse mesmo período alcançou apenas 59,3%, o de leite de cabra 85,0% e de ovelha 54,5%, o que sinaliza, indiscutivelmente, a importância da evolução da bubalinocultura leiteira.

Mundialmente, entre os tipos de leite comercializados, o bovino é o mais importante (respondendo por quase 83,5% do total), seguido pelo bubalino (quase 13% do total) (GUIMARÃES et al., 2013). No Brasil, a produção média de leite bubalino é de 1.583 litros por lactação, sendo que cerca de 30,9% das búfalas produzem mais de 2.000 litros de leite por lactação (NARDI & SANTOS, 2013). No Brasil, não existe informação oficial atual sobre o volume de leite de búfala produzido anualmente, mas acredita-se que a produção venha acompanhando a tendência mundial. Nos últimos dados oficiais brasileiros, em 2006 foram produzidos no Brasil 45.955 mil litros de leite de búfala (IBGE, 2006).

## **2.2. Características gerais do leite de búfala**

O leite de búfala apresenta características que o diferenciam de qualquer outro tipo de leite. Seus teores de lipídeos, proteínas, lactose, sólidos totais e resíduo mineral fixo revelam grande importância nutricional. Uma das suas características mais marcantes é a ausência de  $\beta$ -caroteno em sua composição, que lhe confere uma coloração branca. O leite de búfala possui alto teor de seus constituintes, apresentando teores médios de 7,73% de gordura, 4,23% de proteína e 4,90% de lactose (MACEDO et al., 2001; ROSATI & VAN VLECK, 2002; PIGNATA et al., 2014). Portanto, o leite de búfala é mais concentrado que o leite bovino, apresentando assim menos água (cerca de 83% de umidade) e mais matéria seca (17% de extrato seco total) (MACEDO et al., 2001). Os componentes do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) podem variar em função de fatores ambientais (estação do ano, nutrição) e efeito do animal (raça, idade, estágio da lactação) (TEIXEIRA, BASTIANETTO & OLIVEIRA, 2005; SHELKE, THAKUR e AMRUTKAR, 2012).

As proteínas do leite de búfala são similares às aquelas no leite de vaca, porém não são idênticas e não se encontram nas mesmas proporções. A porção proteica do leite de búfala é constituída por micelas de caseína subdivididas nas frações  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína e apresentam em média 35%, 15%, 32% e 5% do total proteico, respectivamente. Em média, a caseína do leite de búfala possui uma quantidade 25,5% superior de aminoácidos essenciais que o leite bovino (RONCADA et al., 2012).

A gordura do leite de búfalas contribui para o sabor característico do leite e derivados e melhora sua textura. Sob o ponto de vista nutritivo, este constituinte apresenta níveis apreciáveis de ácidos graxos essenciais no leite de búfala possuindo uma proporção de ácido graxo saturado/ácido graxo polinsaturado nutricionalmente corretos (FIGUEIREDO, LOURENÇO & TORO, 2010). A gordura é o mais variável e um dos mais importantes componentes do leite, oscilando, em média, entre 5,5% e 8,5 % nos bubalinos (DUARTE et al., 2001; ROSATI & VAN VLECK, 2002). Com relação aos lipídios, os glóbulos são maiores em relação ao leite bovino, encontrando-se em dispersão e instáveis. Por este motivo, os lipídios são as únicas substâncias que podem ser facilmente extraídas do leite sem promover modificações nos outros constituintes (PRESTES et al., 2013). Apesar de bastante alta, a porcentagem de matéria gorda no leite de búfala é variável em função das raças e das regiões onde se encontram os animais. As fases da lactação também alteram o percentual de gordura, aumentando gradativamente com o transcorrer da mesma (FONSECA et al., 2010).

A lactose, dissacarídeo composto por glicose e galactose, é o único carboidrato presente no leite. É o principal constituinte nos processos de acidificação e também está relacionada com o valor nutritivo, textura e solubilidade, desempenhando papel preponderante na cor e sabor dos produtos elaborados. Em bubalinos, os teores de lactose médios são de 5,1% (GONZÁLEZ et al., 2001).

### **2.3. Leite em pó: definição, produção e mercado**

O leite em pó é um alimento complexo composto por água, lactose, gorduras, proteínas (principalmente caseína), minerais e vitaminas em diferentes estados de dispersão (FRANCO, 2007).

O elevado valor nutricional do leite de búfala gera a necessidade de aprimoramento de técnicas a fim de garantir um produto seguro e saudável e com maior tempo de conservação. Dentre estas técnicas, a secagem para obtenção do produto em pó torna-se uma das mais indicadas para o seu aproveitamento, pois, além de promover o aumento da vida de prateleira em decorrência da redução atividade de água (aw) do produto, nesse tipo de processo, os nutrientes são conservados quase que completamente. Outras vantagens desta tecnologia são que o produto em pó possibilita um transporte mais econômico, planejamento de produção, distribuição e a fabricação de diversos derivados (MEDEIROS, 2010).

Segundo a legislação nacional, entende-se por leite em pó o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Este deve atender ao

Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó definido pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que tem como objetivo e alcance fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que o leite em pó destinado ao consumo humano deverá apresentar (BRASIL, 2006). Ressalta-se que a legislação vigente define apenas o produto derivado do leite de vaca, mas leites de outras espécies também podem ser produzidos em escala comercial.

Na produção do leite em pó integral, o leite é submetido a uma série de processos como agitação, bombeamento, aquecimento, concentração, homogeneização. Estes tratamentos ocasionam algumas interações físicas e químicas entre os componentes do leite (micelas de caseína, proteínas do soro, glóbulos de gordura e minerais), as quais são de fundamental importância para determinar as propriedades do leite ao ser reconstituído em água (FONSECA et al., 2010).

Na produção do leite em pó a água, que é o maior componente do leite in natura, com aproximadamente 87,5%, é eliminada por meio de um processo que envolve operações unitárias, evaporação e secagem por pulverização (atomização, nebulização), restando o extrato seco do leite e uma pequena quantidade de água, cerca de 2,5% a 4,0%. Como o leite em pó é resultado do processamento industrial, no qual apenas o conteúdo de água da emulsão é eliminado, a presença de gordura irá influenciar seriamente nas dificuldades de fabricação do leite em pó, devido principalmente ao risco de oxidação e rancificação durante o processo de armazenamento (FOSCHIERA, 2004).

A gordura livre com o ponto de fusão mais alto atua como agente hidrofóbico na superfície das partículas, prejudicando a sua reconstituição em água a temperaturas inferiores a 45°C. Para minimizar este efeito, pode-se, após a secagem do leite, efetuar um rápido resfriamento do pó até temperatura ambiente, o que evita a liberação parcial da gordura. Outro método bastante utilizado nas indústrias é adição ao leite de agentes surfactantes, que recobrem a superfície das partículas formando uma camada hidrofílica ou umidificante. A lecitina é o agente ativo natural mais usado e aceito na produção do leite em pó (HAHNE & PASSOS, 2001).

O leite em pó, além de ter lugar de destaque na alimentação da população, possui grande importância sob o ponto de vista econômico. No contexto nacional, observa-se que a produção de leite em pó não consegue atender ao aumento de demanda no país, visto que a modernização das indústrias nacionais de laticínios é ainda lenta. Grandes indústrias estrangeiras produzem a maior parte do leite em pó consumido no Brasil, competindo em preço e qualidade com as indústrias nacionais. Tal competição, que se torna cada vez mais acirrada, tem forçado as indústrias brasileiras a investir em seu processo de produção, visando

uma expansão em sua capacidade produtiva. Uma maior produção de leite em pó de boa qualidade e com preços competitivos tem no mercado atual um consumidor potencial (MEDEIROS, 2010).

#### **2.4. Propriedades físicas e químicas do leite em pó**

Os alimentos em pó apresentam diferentes propriedades físicas (tamanho e distribuição das partículas, porosidade, solubilidade, molhabilidade, dispersibilidade, entre outras), sendo que a medida e a caracterização destas propriedades ajudam a definir o produto, os parâmetros do processo de produção e os fenômenos que influenciam no seu comportamento (VISSOTTO et al., 2006).

As propriedades de leite em pó variam consideravelmente dependendo do tipo, da composição do pó e dos tratamentos administrados ao leite durante a concentração e processo de secagem (KELLY, KELLY & HARRINGTON, 2002). Embora o leite em pó seja microbiologicamente estável, muitas alterações físicas e químicas, tais como a cristalização de lactose, aglomeração das partículas, oxidação de gorduras devido a altas temperaturas utilizadas, reação de Maillard e reações enzimáticas, podem ocorrer durante o processo de fabricação e armazenamento (NADAL et al., 2007; SCHEIDEGGER et al., 2013), e essas modificam as propriedades físicas e funcionais (por exemplo, fluidez, propriedades de reconstituição e propriedades emulsionantes de formação de espuma) dos pós (THOMAS et al., 2004).

Vários fatores podem contribuir para causar alterações nas propriedades físicas e químicas do leite em pó integral, reduzindo sua vida de prateleira e seu valor comercial. Porém, os principais fatores envolvidos na deterioração da qualidade do produto são a absorção de umidade e temperatura de armazenamento (REH, BHAT & BERRUT, 2004).

A absorção de umidade durante o tempo de armazenamento pode provocar a cristalização da lactose, pois o leite em pó contém grande concentração da mesma. No leite em pó recém-fabricado, a lactose está no estado metaestável (como o vidro), mas durante o armazenamento ela é transformada em cristais estáveis. A cristalização da lactose pode aumentar a atividade de água, que, por sua vez, aumenta a cristalização da lactose e inicia reações químicas que podem deteriorar o produto (THOMSEN et al., 2005; RIBEIRO & ELISENA, 2007). Neste processo, a gordura e proteína presentes no interior da partícula do leite em pó migram para superfície promovendo, portanto, a aglomeração das partículas e oxidação mais acelerada do produto (NADAL et al., 2007). A presença da gordura na superfície das partículas do leite em pó também pode afetar suas propriedades físicas, pois o

leite se torna mais hidrofóbico interferindo assim nos parâmetros de solubilidade, molhabilidade e escoamento do leite em pó (KIM, CHEN & PEARCE, 2002). Segundo Vissoto et al. (2006), quando um pó é adicionado sobre a superfície de um líquido, as etapas que ocorrem são: molhabilidade, que consiste na penetração do líquido para o interior da estrutura do pó devido à capilaridade; imersibilidade, que é a imersão das partículas ou de porções do pó no líquido; dispersibilidade, ou seja, a dispersão do pó no líquido; e a solubilidade, que é a dissolução das partículas pelo líquido, desde que estas sejam solúveis. Portanto, as características de molhabilidade vão interferir no processo de diluição e hidratação na reconstituição do leite em pó.

Enquanto a lactose permanecer em seu estado amorfo ela promoverá estabilidade no leite em pó integral, pois a camada de lactose formada durante a secagem protege os glóbulos de gordura e evita assim o contato do oxigênio com a gordura retardando, portanto, a oxidação lipídica (ARAÚJO, 2011).

O prazo de validade do leite em pó é geralmente estabelecido para garantir a segurança microbiológica e para manter as características sensoriais aceitáveis (por exemplo, cor, sabor). Geralmente, a vida útil do leite em pó é de 6 meses em temperatura ambiente, mas ela pode ultrapassar 12 meses se o produto for embalado a vácuo ou sob atmosfera modificada com nitrogênio (PERIN et al., 2012).

## **2.5. Secagem do leite em spray dryer**

Dentre os processos de conservação do leite, a secagem está entre os mais importantes, por prolongar a vida útil deste alimento sem alterar muito as suas características de qualidade. Existem diversas técnicas de desidratação para conservação de alimentos, entre elas se destacam a secagem por atomização (DINIZ et al., 2005; FAVARO-TRINDADE et al., 2010; SCHUCK et al., 2013), rolo ou tambor de secagem (AZEREDO, 2005) e liofilização (VIEIRA, NICOLETI & TELIS, 2012; MARTINHAGO et al., 2015).

A liofilização é um processo de estabilização, no qual uma substância é previamente congelada e então a quantidade de solvente (geralmente água) é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção, para valores tais que impeçam atividade biológica e reações químicas (MARQUES & FREIRE, 2005). Este é um processo que se mostra eficiente comparado com outros meios de desidratação, frente características como contração do produto, perda de voláteis, decomposição térmica, ações enzimáticas e desnaturação de proteínas (TATTINI, PARRA & PITOMBO, 2006). Porém, o processo é lento, podendo demorar até 48 horas, dependendo do tamanho do lote e das unidades a serem liofilizadas,

umentando o custo do processo, além de já envolver um alto custo de obtenção e manutenção do equipamento (3 vezes mais que em outros métodos de secagem) e também alto custo energético (2 a 3 vezes mais que em outros métodos de secagem) (TERRONI et al., 2013).

O rolo ou tambor de secagem é constituído de um ou dois tambores, rotativos, com diâmetro variável (0,5 a 1,5m), medindo de dois a cinco metros de comprimento, aquecidos internamente pelo uso de vapor e usados na desidratação de produtos especiais, principalmente aqueles com alto teor de amido. É um processo antigo na produção de leite em pó, sendo hoje usado na produção de leites modificados, em pó (GAVA, SILVA & FRIAS, 2008). São úteis para alimentos relativamente resistentes ao calor (flocos de batata, soro, sopas), embora os produtos finais tenham, em geral, sabor e odor de cozidos.

Já a secagem por atomização spray dryer é a que tem maior destaque na produção de leite em pó. Esta técnica de secagem é uma operação unitária que consiste na transformação de um produto no estado líquido, podendo o mesmo ser uma solução, emulsão ou suspensão, em um produto particulado, seco através da nebulização do líquido e exposição da névoa formada a uma substância gasosa aquecida (CAL & SOLLOHUB, 2010). É um processo único no qual as partículas são formadas de forma quase instantânea, na mesma hora em que são secas sendo muito utilizado para a produção de forma contínua de sólidos na forma de pós, grânulos ou aglomerados (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005; GHARSALLAOUI et al., 2007; CAL & SOLLOHUB, 2010; PEIGHAMBARDUST, TAFTI & HESARI, 2011).

Por meio da remoção de água e, portanto, diminuição da atividade de água, a secagem por spray dryer garante maior estabilidade microbiológica, diminui o risco de degradação química e/ou biológica, reduz custos de transporte e armazenamento além de promover a obtenção de um produto com propriedades específicas, como o produto instantâneo (GHARSALLAOUI et al., 2007).

O processo de secagem por pulverização envolve principalmente cinco etapas: concentração, atomização, contato da gota com ar, secagem e separação de gotículas (PATEL, PATEL & SUTHAR, 2009). Todas essas etapas são de extrema importância para as propriedades finais do produto e eficácia do processo de secagem (PRINN, CONSTANTINO & TRACY, 2002; CAL & SOLLOHUB, 2010). Basicamente, um spray dryer consiste de uma bomba de alimentação do produto líquido, um atomizador, um aquecedor de ar, um soprador/aspirador para fornecimento do ar de secagem, uma câmara de secagem, um separador para separar o pó formado do ar e um frasco coletor (PEIGHAMBARDUST, TAFTI & HESARI, 2011).

Os pós produzidos por spray dryer reúnem padrões elevados de qualidade com relação à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade e forma, sendo que estas características podem ser alteradas por modificações nos parâmetros do processo (SOUZA, 2003).

O dimensionamento de equipamentos, tais como os secadores, os quais envolvem operações de aquecimento, resfriamento, bombeamento, aspersão e pulverização de materiais, exige dados precisos das propriedades físicas, físico-químicas e térmicas destes materiais, e de como estas propriedades se comportam com variações de temperatura, pressão, umidade e/ou concentração de sólidos durante as diversas etapas do processo. A falta de conhecimento dessas características pode levar à obtenção de um produto inadequado, gerando prejuízos que poderiam ser facilmente evitados. Além disso, para modelar, simular, otimizar e controlar estas etapas de processo é indispensável o conhecimento dessas propriedades, tais como densidade, tensão superficial, comportamento reológico, condutividade térmica, difusividade térmica e mássica e calor específico, em função das características dos materiais e das variáveis operacionais do processo (MEDEIROS, 2010).

A transformação de uma gota de leite numa partícula é bastante complexa. Este processo envolve a concentração dos vários componentes do leite, tais como lactose, gordura e proteína. A umidade presente na gotícula se evapora e promove o desenvolvimento subsequente de uma capa em sua superfície. Porém, podem ocorrer variações na morfologia das partículas do leite em pó durante o processo de secagem. Dependendo da temperatura utilizada na secagem, podem ser formados vacúolos (bolhas de vapor) dentro da gota, o que irá afetar a porosidade da partícula. Por outro lado, podem ocorrer durante a secagem a migração de componentes de leite através da fase aquosa em direção à superfície, assim a umidade superficial, as concentrações de gordura e lactose irão afetar a aderência e a aglomeração das partículas, influenciando, conseqüentemente, a distribuição do tamanho de partícula, densidade e fluidez do leite em pó resultante (KIM, CHEN & PEARCE, 2009).

Leites em pó são produzidos por spray de secagem para conter componentes (gordura, proteína, lactose) distribuídos uniformemente. No entanto, estes componentes são redistribuídos durante o processo de formação de gotículas resultando em partículas que apresentam heterogeneidade entre a superfície e o núcleo. Além disso, a heterogeneidade da superfície/núcleo pode ser acentuada pela embalagem, o armazenamento e/ou condições de transporte (FITZPATRICK et al., 2007; KIM, CHEN & PEARCE, 2009; GAIANI et al., 2009). Por sua vez, a composição da superfície da partícula tem forte impacto sobre as propriedades funcionais do pó (propriedades de reconstituição, aderência, fluidez, oxidação entre outras). Com a produção de alimentos em pó aumenta a necessidade de

entender o comportamento desses pós em relação às suas propriedades funcionais. Para isso, um número cada vez maior de métodos tem sido utilizado ou estão em desenvolvimento para permitir a caracterização da superfície do leite em pó (MURRIETA-PAZOS et al., 2012).

## **2.6. Microscopia Eletrônica**

A principal função de qualquer microscópio é tornar visível ao olho humano o que for muito pequeno para tal. A diferença básica entre os microscópios ótico e eletrônico é que neste último não é utilizada a luz, mas sim feixes de elétrons. No microscópio eletrônico não há lentes de cristal e sim bobinas, chamadas de lentes eletromagnéticas. Estas lentes ampliam a imagem gerada pela passagem do feixe de elétrons no material e a projetam em uma tela onde é formada uma imagem de pontos mais ou menos brilhantes. O microscópio eletrônico permite aumentos de 5 a 500 mil vezes. No entanto, é impossível observar material vivo neste tipo de microscópio. O material a ser estudado passa por um complexo processo de desidratação, fixação e inclusão em resinas especiais muito duras, que permitem cortes ultrafinos por meio das navalhas de vidro de ultramicrótomo (EMBRAPA, 2005).

Existem vários tipos de microscópios eletrônicos, que variam de acordo com suas especificidades: o de transmissão (MET), o de varredura (MEV), o de alta voltagem e de tunelamento quântico e de força atômica, sendo o mais utilizado para a análise da superfície do leite em pó o MEV (THOMAS et al., 2004; GAIANI et al., 2007).

O microscópio eletrônico de varredura é o mais versátil instrumento para avaliação, exame e análise das características microestruturais de amostras biológicas e não-biológicas. Pode fornecer rapidamente informações sobre a estrutura e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, portanto, sua utilização é comum em diversas áreas de estudo. A grande vantagem deste instrumento é a elevada profundidade de campo, da ordem de 10  $\mu\text{m}$  para aumentos de cerca de 10.000 mil vezes, chegando a 1 cm para aumentos de 20 vezes (DEDAVID, GOMES & MACHADO, 2007).

O princípio de funcionamento de um MEV consiste em um feixe de elétrons de pequeno diâmetro que explora a superfície da amostra, ponto a ponto, por varredura em linhas sucessivas, onde o sinal é transmitido a um detector e este a uma tela catódica. As bobinas de exploração eletromagnéticas, alimentadas por um gerador de varredura, fazem com que o feixe explore a superfície da amostra aproximadamente de 10 em 10nm. O sinal de imagem resulta da interação do feixe de elétrons incidente com a superfície da amostra. O detector é quem recebe o sinal e modula o brilho do monitor, permitindo a observação (DEDAVID, GOMES & MACHADO, 2007).

Para a análise de produtos como o leite em pó, material não condutor, é necessária a aplicação de uma camada condutora, geralmente ouro (ou ouro/paládio). Essa camada é usualmente depositada pelo processo de "sputtering", embora possam também ser evaporados em alto vácuo. No sistema de "sputtering" o depósito do metal é bastante eficiente, mesmo em objetos muito irregulares, pois os átomos atingem sua superfície oriundos de todas as direções. A espessura da camada de ouro deve ser suficientemente fina para não influir na resolução da imagem, mas suficientemente espessa, para garantir uma boa produção de elétrons secundários, que serão usados para formar a imagem (CASTRO, 2001).

A utilização da microscopia eletrônica torna possível observar a superfície do leite em pó que pode sofrer alterações durante a armazenagem. Assim, análises decorrentes da deterioração das muitas propriedades existentes na interface entre as partículas do leite em pó e ambiente (por exemplo capacidade de escoamento, molhabilidade e estabilidade oxidativa) poderão ser feitas (KIM, CHEN & PEARCE, 2009; SHEIDEGGER et al., 2013).

## **2.7. Estudos proteômicos**

A técnica proteômica é uma metodologia que tem sido utilizada no estudo e caracterização de proteínas de leite e produtos lácteos e onde o preparo da amostra é fundamental para uma boa análise. Diversas estratégias são utilizadas para preparar amostras biológicas para estudos proteômicos, porém como esta etapa é fundamental, deve-se tomar certas precauções (YAMADA et al., 2002; MANSO, LEONIL & GAGNAIRE, 2005; FONG, NORRIS & PALMANO, 2008).

Em estudos de proteômica, uma boa preparação da amostra, ou seja, a extração do máximo número de proteínas de uma dada célula, tecido, órgão ou organismo é o mais importante passo para a subsequente separação, resolução e identificação das proteínas (PARK, 2004). Sendo assim, a primeira etapa a ser realizada em estudos de proteômica consiste na padronização do processo de extração proteica para o tipo de tecido estudado, com o objetivo de se ter bom rendimento em termos quantitativos, além de uma variabilidade de bandas, de forma a maximizar o número de proteínas presentes na amostra a ser avaliada (SILVA & SOUZA, 2009).

Devido à grande diversidade de amostras proteicas, o procedimento ótimo para qualquer tipo de amostra deve ser determinado empiricamente. Idealmente o processo resulta na completa solubilização, desagregação, desnaturação e redução das proteínas da amostra (AMERSHAM-BIOSCIENCES, 2004). No geral, o ideal é manter o preparo de amostras o mais simples possível, para evitar perdas. Um preparo de amostra básico consiste na ruptura

celular (quebrar da membrana ou parede celular das células presentes na amostra, para liberação as proteínas) e solubilização destas proteínas de modo a se obter amostras adequadas para se conseguir uma boa dosagem proteica. Para este estudo vários métodos podem ser utilizados para identificar novas proteínas em amostras complexas. Entre estes, o método a base de gel tem sido o método de escolha, como a eletroforese (WU et al., 2006).

### **2.7.1. Eletroforese desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese é utilizada para separar misturas complexas de proteínas, para investigar composições de subunidade ou para purificar as proteínas para utilização em outras aplicações, a partir de células, matrizes alimentares, frações subcelulares ou imunoprecipitados (SCHRÖDER et al., 2008). Esta metodologia é amplamente utilizada em pesquisas com a finalidade de identificar fraudes em alimentos e a possível presença de proteínas estranhas à composição normal de produtos cárneos e lácteos (STEPHAN, 2006; XIONG et al., 2006; ANEMA, 2009). Assim, as frações proteicas do leite em pó podem ser determinadas obtendo-se informações adicionais sobre as diferentes frações (FARREL et al., 2004).

A eletroforese se baseia na separação através da migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, permitindo que um pesquisador possa estimar rapidamente o número de frações proteicas diferentes em uma mistura. Normalmente, a eletroforese é efetuada em suporte que pode ser sílica gel, géis de amido, ágar, papel de filtro, acetato de celulose e poliacrilamida. Dependendo do suporte que é utilizado para a eletroforese e da natureza das macromoléculas, pode-se separá-las com base na carga ou no seu tamanho. Os géis apresentam vantagens em relação a outros suportes porque são meios porosos em que o tamanho dos poros é da mesma ordem de grandeza do tamanho das moléculas de proteína. Assim, funcionam como uma peneira molecular e a separação acontece em função da massa molar (BALDASSO, BARROS & TESSARO, 2011).

A escolha do material da matriz depende da resistência necessária para a separação efetiva dos fragmentos proteicos. O gel de poliacrilamida é o mais utilizado, não só porque sua porosidade permite melhor separação relativamente a outros géis, como também por ser um polímero sintético, preparado a partir de reagentes de elevado grau de pureza. Este tipo de gel tem também a vantagem de ser quimicamente inerte, estável numa gama extensa de pH, temperatura e força iônica. A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, do inglês sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis) é um dos métodos mais simples e baratos para se analisar proteínas (BALDASSO, BARROS & TESSARO, 2011).

Segundo Figueira et al. (2011), antes da realização da corrida eletroforética todas as proteínas devem ser desnaturadas e o método mais utilizados para tal é o dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um tipo de reagente que tem alta carga negativa e uma calda hidrofóbica, com função de carregar as proteínas negativamente. Também se utilizam agentes redutores, como ditioneitol - DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol, que destroem as pontes dissulfeto, responsáveis pela estrutura original das proteínas, auxiliando na separação das cadeias polipeptídicas. Em geral, o gel de poliacrilamida é confeccionado entre duas placas de vidro, nesse momento são efetuadas aberturas no gel, chamados de poços, para a inserção das amostras. Após a distribuição das amostras no aparato, aplica-se a corrente elétrica e a corrida eletroforética ocorre em direção ao polo positivo, devido à maior concentração de carga negativa das amostras, conferida pelo reagente SDS. Os fragmentos menores migram mais rapidamente, enquanto os maiores se movimentaram mais lentamente, devido à maior dificuldade de se mobilizar entre a malha do gel (ROCHA, 2005; GREPPI, 2013). Assim, a combinação do tamanho do poro, da carga e da massa molecular aparente da proteína determina a taxa de migração da mesma pelo gel (AQUINO, 2013).

Marques et al. (2011) empregaram a técnica de SDS-PAGE para caracterizar leite em pó e determinar adulteração em amostras contendo diferentes concentrações de soro, utilizando misturas de soro de leite em pó nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10% ao leite em pó, e após a análise eletroforética conseguiram identificar a adição de soro de leite por meio da mobilidade eletroforética relativa e massas moleculares das respectivas frações proteicas, porém não conseguiram ter discernimento da correlação entre o nível de adição e a quantidade de soro adicionada.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Obter leite em pó integral de búfala por meio de secagem em mini spray dryer e avaliar suas características físicas, químicas, estruturais e proteômicas durante seu armazenamento.

#### **3.2. Objetivo específico**

- (i) Caracterizar as amostras de leite em pó de búfala para os parâmetros de qualidade no momento de sua obtenção e durante seu período de estocagem (30, 60, 90, 120 e 150 dias);
- (ii) Caracterizar as amostras de leite em pó de búfala por meio de microscopia eletrônica no momento de sua obtenção e durante seu período de estocagem (30, 60, 90, 120 e 150 dias);
- (iii) Avaliar o perfil proteômico do leite em pó elaborado no momento de sua obtenção e durante seu período de estocagem (30, 60, 90, 120 e 150 dias);

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Produção do leite em pó**

O leite utilizado para a produção do leite em pó foi obtido em um sistema de produção localizado na região de Maiquinique-BA, oriundo de búfalas Murrah, ordenhadas mecanicamente entre os meses de outubro e novembro. Antes da secagem o leite foi analisado quanto à acidez, densidade, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteína e índice crioscópico, conforme BRASIL (2006), sendo também realizada a pasteurização lenta (temperatura de aproximadamente 65°C por 30 min).

O leite de búfala foi submetido à secagem por atomização, em um mini spray dryer modelo MSD 3.0 (LABMAQ Brasil LTDA) em ciclo co-corrente, com temperatura do ar na entrada e saída do secador de 140°C e 80°C, respectivamente. A produção de leite em pó foi realizada em 3 repetições e para cada repetição foram processados 10 litros de leite de búfala mantidos em temperatura de 27°C durante o processo de secagem. As amostras obtidas foram embaladas em seladora à vácuo modelo BS320 (R.BAIÃO Brasil LTDA), em embalagens de películas laminadas (incoplast) e estocados por 30, 60, 90, 120 e 150 dias em temperatura ambiente de aproximadamente 27°C. A produção do leite em pó foi realizada no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

### **4.2. Rendimento de fabricação do leite em pó**

O rendimento do processo de obtenção do leite em pó foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Rendimento \%} = (m_f/m_i) \times 100 \quad \text{eq. (1)}$$

Em que:

$m_i$  = Massa do leite fluido (Kg)

$m_f$  = Massa do leite em pó (Kg)

### **4.3. Avaliação da qualidade físico-química do leite em pó**

#### **4.3.1. Análises da composição do leite em pó**

As análises de composição foram realizadas em triplicata, no momento de sua obtenção (tempo 0) e durante os períodos de estocagem (tempos de 30, 60, 90, 120 e 150 dias). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e no Laboratório de Avaliação da Identidade e Qualidade do Leite em Pó da Indústria de Laticínios Vale Dourado, segundo BRASIL (2006), onde o teor de umidade foi determinado por meio de medidor infravermelho modelo IV2000 (GEHAKA Brasil LTDA), o teor de gordura determinado por método butirométrico, a acidez titulável determinada com a utilização da solução Dornic, as cinzas por meio do método gravimétrico, utilizando mufla modelo LS20 (FORLABO Brasil LTDA) e o teor de proteínas por meio do método micro Kjeldahl.

O índice de solubilidade foi determinado transferindo-se 100 mL de água destilada para a jarra do mix e posteriormente adicionada à amostra previamente pesada (13 g de leite em pó), assim foi feita a mistura em temperatura ambiente até completa diluição. Após a diluição, uma alíquota de 50 mL foi retirada, diluída e colocada em um tubo de centrífuga com escala volumétrica (0,1 a 1 mL) e em seguida realizada a centrifugação da amostra a 3000 rpm, em centrífuga excelsa modelo 206 (FANEM e MERSE Brasil LTDA), por cerca de 5 minutos. Em seguida, foi realizada a remoção do sobrenadante para que a leitura do material que ficou contido no fundo do tubo fosse realizada. Os resultados foram expressos em volume de sedimento (mL/T°C).

A quantidade de partículas queimadas foi determinada por comparação com o gráfico ADPI: Padrões de Partículas Queimadas para Leites Desidratados (BRASIL, 2006). Transferiu-se 250 mL de água deionizada para a jarra do misturador com aproximadamente 32,5g do leite em pó integral e foi realizada mistura por cerca de 1 min. Em seguida foi realizada a filtração de todo o conteúdo da jarra através do disco padrão (papel filtro) instalado no equipamento de filtração por pressão. O filtro foi então fixado em um cartão apropriado e deixado para secar em estufa a 30 - 40°C por aproximadamente 3 horas. O disco seco foi comparado com o cartão comparador, sob luz uniforme e indireta. Utilizou-se a escala de valores de 7,5mg (Disco A), 15,0mg (Disco B), 22,5mg (Disco C) e 32,5mg (Disco D).

### **4.3.1.1. Análise eletroforética SDS-PAGE do leite em pó**

#### **4.3.1.1.1. Preparação das amostras**

Foram pesadas em eppendorfs cerca de 0,0020g de cada amostra, que foram diluídas em 800 µL de solução tampão Tris-HCl (pH = 6,8), na presença de 0,1% de SDS (dodecil sulfato de sódio) e 5% de β-mercaptoetanol. Em seguida, foram aquecidas a 100°C por 3 minutos e acrescidas de 200 µL da solução contendo 10% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Por fim, foram congeladas até o momento da corrida eletroforética (EGITO et al., 2006).

#### **4.3.1.1.2. Análise do perfil eletroforético**

A caracterização eletroforética das amostras de leite em pó de búfala foi realizada segundo metodologia recomendada por Egito et al. (2006), por meio do método de gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, ou seja, com adição de SDS, em aparelho para eletroforese vertical da marca Apelex.

#### **4.3.1.1.3. Método SDS-PAGE**

A técnica de SDS-PAGE foi realizada mediante géis de separação com 15% de poliacrilamida em 380 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS e com géis de concentração/empilhamento de 5% de poliacrilamida em 125 mmol/L de tampão Tris-HCl, pH 6,8.

#### **4.3.1.1.4. Preparação dos géis**

A preparação do gel de separação (Tabela 1) e do gel de concentração/empilhamento (Tabela 2) seguiu metodologia proposta por Egito et al. (2006) com modificações realizadas por Faleiro (2013), pois foram utilizadas placas de mini-géis.

Tabela 1. Componentes do gel de separação

<b>Reagentes</b>	<b>Volume utilizado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Solução de acrilamida	4110
Tampão de separação	2560
SDS a 10%	100
Temed	10
Persulfato de amônio	67

Após a preparação do gel de separação, o mesmo foi vertido entre as placas de vidro e, em seguida, acrescentado de água destilada na parte superior, para auxiliar na polimerização. Esse processo durou, aproximadamente, 30 minutos. Após a polimerização do gel, a solução de concentração/empilhamento a 5% foi preparada conforme descrito na Tabela 2. Em seguida, adicionou-se a solução de concentração lentamente sobre o gel de separação polimerizado. Um molde em forma de pente foi acomodado sobre o gel de concentração, com o objetivo de formar canaletas/poços que permitam a aplicação das amostras. Novamente, foi aguardada a polimerização do gel por aproximadamente 30 minutos. Após a polimerização do gel de concentração, foi retirado o pente e com a ajuda de uma micropipeta foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra, de modo que a quantidade de proteína aplicada em cada canaleta/poço fosse de 20  $\mu\text{g}$ . As canaletas/poços das extremidades foram descartadas, a primeira foi destinada ao padrão de peso molecular enquanto as canaletas intermediárias foram utilizadas para as amostras nos determinados tempos de armazenamento (0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias).

Tabela 2. Componentes do gel de concentração/empilhamento

<b>Reagentes</b>	<b>Volume utilizado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Solução de acrilamida	520
Tampão de concentração	1010
SDS a 10%	40
Temed	4
Persulfato de amônio	80

#### **4.3.1.1.5. Corrida eletroforética**

A caracterização eletroforética de cada amostra foi realizada em triplicata. A migração das proteínas teve duração de aproximadamente 1 hora e 30 minutos e foi realizada com uma

corrente elétrica constante de 250 V, amperagem de 30 mA e temperatura controlada entre 4 e 8 °C.

#### **4.3.1.1.6. Fixação das proteínas**

Terminada a corrida eletroforética, o gel foi retirado das placas de vidro e imerso em solução corante com 0,1% de Azul de Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120 min. A descoloração foi realizada durante 12 horas com uma solução de 30% de metanol e 7,5% de ácido acético.

A seguir o gel foi escaneado e, posteriormente, submetido a nova coloração por Nitrato de Prata (BLOOM, BEIER & GROSS, 1987). Para este procedimento o gel de poliacrilamida, corado com Azul de Coomassie R250, foi descorado e submetido à lavagem com água destilada em 3 incubações de 20 minutos. Logo após o gel foi incubado em uma solução de Tiosulfato de sódio por 1 minuto e posteriormente submetido a uma solução de Nitrato de Prata por 30 minutos sob agitação lenta. Após a incubação, adicionou-se ao gel a solução reveladora até o aparecimento das bandas coradas. A reação foi interrompida com adição de ácido acético a 1%.

Todas corridas eletroforética nos géis foram digitalizados por meio de câmera fotográfica e suas imagens armazenadas para, posteriormente, identificação das bandas.

#### **4.3.2. Densitometria das frações proteicas**

Nas análises densitométricas foi utilizado um software Gel Analyzer 2010a (GA, 2015) para a avaliação quantitativa de cada banda proteica, separadas por meio da técnica eletroforética e para estimar as massas moleculares referentes a cada banda presente nos géis das amostras avaliadas.

#### **4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Santa Cruz- UESC, as amostras de leite em pó foram montadas de modo adequado no suporte porta-amostras (“stub”) com o uso de guias de carbono adesivas dupla face e em seguida revestidos com ouro/paládio (metalização), para promover ou aumentar a condutividade da superfície da amostra. A metalização foi realizada em equipamento modelo SCD-050 (Bal-Tec). Logo após a metalização foram feitas

as leituras das amostras no microscópio eletrônico de varredura modelo Quanta 250 (FEI Company). Foram obtidas imagens nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de estocagem.

#### **4.4. Planejamento Experimental**

Para verificar o efeito do tempo de armazenamento do leite em pó sobre os parâmetros físicos e químicos (gordura, acidez, umidade, cinzas, índice de solubilidade, densidade e proteína) foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado-DIC realizando a Análise de Variância (ANOVA) dos dados e regressão, em nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System), versão 9.0 (SAS).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise do leite de búfala in natura

O leite de búfala utilizado para a obtenção do leite em pó foi inicialmente avaliado quanto à acidez, densidade, índice crioscópico, teores de gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e proteína (Tabela 3).

Tabela 3. Médias±desvio padrão da Composição do leite de búfala in natura

Composição	Valores
Gordura (%)	5,3±0,7
Proteína (%)	3,4±0,2
Acidez (°D)	16±0,0
Densidade (g/mL)	1,0315±0,0
EST (%)	14,36±0,3
ESD (%)	9,03±0,6
Índice Crioscópico (°H)	-0,543±0,0

°D = graus Dornic; EST= extrato seco total; ESD = extrato seco desengordurado; °H = graus Hortvet.

A composição do leite de búfala é essencial para a obtenção de um produto com características de qualidade. O leite de búfala utilizado para a realização do trabalho apresentou resultados médios esperados para o leite da espécie (Tabela 3). Valores próximos foram encontrados por Araújo et al. (2011) ao avaliarem a influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento, e por Costa et al. (2014) ao avaliarem a sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. É importante destacar que não existe legislação específica para leite de búfala que determina o padrão de identidade e qualidade do mesmo. Até o momento, somente o Estado de São Paulo possui legislação para alguns parâmetros de identidade e qualidade do leite de búfala, estabelecendo valores mínimos para gordura de 4,5%, acidez de 14 a 23°D, pH entre 6,4 e 6,87, extrato seco desengordurado (ESD) mínimo de 8,57%, densidade a 15°C de 1,028 a 1,034g/mL e índice crioscópico entre -0,520 a -0,570°H (SÃO PAULO, 1994). Assim, considerando a legislação estabelecida para o estado de São Paulo, o leite de búfala apresentou características físico-químicas adequadas, com resultados dentro dos padrões estabelecidos.

A densidade do leite de búfala apresenta valores similares ao leite bovino. A densidade é fortemente influenciada pela gordura e extrato seco desengordurado (ESD), pois, a gordura tem menor densidade que a água, enquanto que o ESD tem maior. Assim, um leite desnatado, por conter menor conteúdo de gordura apresentará maior densidade devido ao ESD, estes parâmetros podem ser utilizados para detectar fraudes por adição de água e de solutos, pois qualquer fator que aumente ou diminua o peso ou volume do leite afetará a densidade (MACHADO, 2014). Por apresentar elevada porcentagem de extrato seco desengordurado em relação ao leite de vaca esperava-se que a densidade do leite de búfala fosse maior, porém a maior porcentagem de gordura faz com que a sua densidade apresente valores dentro dos valores determinados e próximos ao encontrado no leite de vaca.

O EST do leite de búfalas é superior ao encontrado no leite bovino, pois o leite de búfala contém maior composição principalmente de lactose, proteínas e gordura sendo, portanto, mais concentrado que o leite bovino, apresentando assim menos água e mais matéria seca (MACEDO et al., 2001). Segundo QUEIROGA et al. (2010), o conteúdo de sólidos totais de uma amostra de leite expressa a concentração de proteínas, lipídeos, carboidratos e minerais. Quanto mais elevada for a quantidade de sólidos totais apresentada por uma amostra de leite, melhor será o seu rendimento para a indústria de laticínios.

## **5.2. Obtenção do leite em pó de búfala e seus parâmetros de qualidade**

Inicialmente foram realizados testes para determinação dos parâmetros ideais do equipamento usado no processo de secagem, com o intuito de se obter o maior rendimento do leite após o processo de secagem. Assim, foram fixadas as temperaturas do ar de entrada da secagem em 140°C, com temperatura do ar de saída de aproximadamente 80°C, bico injetor de 1,0 mm de espessura, com vazão de ar no bico de 40L/min, vazão do ar de secagem 3 m<sup>3</sup>/min e vazão da bomba peristáltica de 1,07 L/h. Com a utilização destes parâmetros o leite em pó de búfala apresentou rendimento de 10% (volume de leite gasto para se obter 1Kg de leite em pó), sendo este o valor máximo em rendimento obtido neste trabalho. Este valor, quando comparado com o teor de sólidos presentes no leite, poderia ter sido maior, porém as limitações do equipamento, como por exemplo a entrada, injeção de baixo volume de leite por hora e a falta da etapa de concentração previa, podem estar associadas a perdas no processo de secagem. Segundo Early (2000), para a obtenção de um produto de melhor qualidade é necessário eliminar do leite a maior quantidade de água possível antes de proceder à secagem por pulverização.

Também vale ressaltar a dificuldade na etapa de atomização devido à grande presença de gordura no leite de búfala, a qual ocasionou a aderência de parte das partículas de leite nas paredes do spray dryer. De acordo com Schuck (2002), as características físicas e funcionais (densidade do pó, higroscopicidade, termo-estabilidade, solubilidade, dispersibilidade, grau de aglomeração, umectabilidade e tamanho da partícula) dependem tanto dos parâmetros obtidos durante a secagem (tipo de equipamento, tipo do bico injetor, vazão do ar e do líquido, pressão do ar, temperatura do ar de secagem) quanto das características do concentrado a ser desidratado (composição, características físico-químicas, viscosidade, termo-estabilidade e disponibilidade de água). O controle destes parâmetros vai indicar se o leite a ser desidratado apresentará características de alta qualidade que garantirão vida útil prolongada ao produto final (WHETSTINE & DRAKE, 2009).

Visto que o teor mais elevado de gordura pode ter dificultado a obtenção de maior rendimento devido à aderência do produto na parede do spray dryer, outra forma de melhorar o processo de obtenção do leite em pó seria por meio da remoção de parte da gordura presente no leite fluido. Porém, a possibilidade de desnate do leite descaracterizaria o produto, já que este é um dos parâmetros que o diferencia do leite de vaca. Portanto, como o leite não foi submetido a nenhuma operação de padronização, mantendo as características do leite, o produto foi caracterizado como integral.

Nas análises de composição realizadas no leite em pó observou-se as características de composição do leite em pó de búfala logo após o processo de secagem e ao longo do tempo de armazenamento de 30, 60, 90, 120 e 150 dias. Equações de regressão foram ajustadas para as variáveis estudadas e assim foi possível ajustar equação de modelo linear ( $p > 0,05$ ) apenas para a variável umidade ( $y = 3,6382x + 0,0048$ ), indicando assim que ocorreu um aumento significativo no teor de umidade do leite em pó durante os 150 dias de estocagem, já os demais parâmetros analisados se mantiveram estáveis com resultados praticamente constantes (Tabela 4).

Tabela 4. Médias dos parâmetros do leite em pó de búfala de acordo ao tempo de armazenamento

Parâmetros	Tempos de armazenamento (dias)						Médias
	T 0	T 30	T 60	T 90	T 120	T 150	
Matéria gorda (%)	33,67	33,77	34,15	34,67	34,25	34,02	34,08
Umidade (%)	3,63	3,72	3,77	4,43	4,25	4,20	4,00
Solubilidade (mL/T°C)	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Densidade (g/mL)	1,0420	1,0435	1,0423	1,0429	1,0420	1,0421	1,0424
Acidez (°D)	11	10	11	11	11	11	10,83
Cinzas (%)	4,84	4,73	4,77	4,79	4,80	4,88	4,80
Proteínas (%)	21,35	21,40	22,02	21,33	21,48	21,52	21,52
Partículas queimadas	Disco B	Disco B	Disco B	Disco B	Disco B	Disco B	Disco B

A acidez foi expressa em graus Dornic; ESD= extrato seco desengordurado.

O teor de umidade do leite em pó apresentou resultado que variou de 3,63% (tempo 0) para 4,2% (tempo de 150 dias de armazenamento) em temperatura ambiente. Conforme Krey et al. (2009), a umidade crítica do leite em pó integral é de 5,0%, pois é a partir desta porcentagem que o produto perde rapidamente seu sabor e inicia alterações indesejáveis, como deterioração microbiana e aglomeração, afetando assim sua solubilidade e outras propriedades físicas.

Segundo Brasil (1997), a faixa ótima para a umidade do leite em pó integral (legislação específica para leite em pó de vaca) é de no máximo 3,5%, e para o parcialmente desnatado e desnatado é de no máximo 4%. De acordo com Medeiros et al. (2014), em valores muito inferiores de umidade, a gordura se torna mais suscetível a reações de oxidação porque os lipídeos perdem a camada monomolecular protetora de água, e em valores superiores são propiciadas reações de cristalização de lactose, desenvolvimento de odores, escurecimento, insolubilização protéica, aumento de acidez, produção de gás carbônico, entre outros.

Segundo Alves (2008), durante o período de estocagem o aumento da umidade do leite em pó é decorrente da transferência de vapor d'água através da embalagem, devido à permeação pelo material ou pela entrada por falhas na região da termoselagem. Provavelmente o mesmo ocorreu com o leite em pó de búfala produzido, pois a umidade foi aumentando com o tempo de armazenamento, o que indica prováveis problemas relacionados com a embalagem do produto. O prazo de validade do leite em pó pode ser de até um ano

quando se obtém ótimas características de qualidade, portanto, esse fato pode se constituir em problemas futuros.

No presente estudo, o produto obtido foi embalado à vácuo em embalagens de filmes metalizados e laminados. Porém mesmo com a aplicação do vácuo, o oxigênio aprisionado entre as partículas de pó ou dissolvido na gordura não se elimina por completo e, depois de alguns dias, pode ser produzida uma dessorção deste oxigênio que se encontra no espaço interparticular, promovendo o processo de degradação com maior rapidez. Como o leite em pó é suscetível à oxidação, a principal precaução a se tomar durante o acondicionamento é a eliminação do oxigênio presente. Para a melhora da conservação do produto, Brasil (1997) recomenda o acondicionamento pode ser feito através da injeção de gases inertes como nitrogênio ou dióxido de carbono ou uma mistura de ambos, evitando que o pó entre em contato com o oxigênio e umidade impedindo a rancificação das gorduras. Contudo o leite em pó de búfala, durante o tempo de 150 dias de estocagem, não apresentou alterações no conteúdo de matéria gorda, indicando, portanto, que não ocorreu oxidação acentuada da gordura durante este período.

Para os demais parâmetros analisados (matéria gorda, cinzas, densidade, proteína, solubilidade, acidez e partículas queimadas) o leite em pó de búfala apresentou resultados dentro do esperado, pois como não existe legislação que determina os parâmetros de qualidade do leite em pó de búfala a legislação do leite em pó de vaca (BRASIL, 1997) foi utilizada como comparativo para avaliar estes parâmetros de qualidade. A legislação atual determina para o leite em pó de vaca valores adequados para a acidez titulável (máximo 18°D), matéria gorda (mínimo 26%), índice de solubilidade (máximo 1,0 mL) e partículas queimadas (máximo disco B). Para o valor de matéria gorda, por apresentar maior porcentagem de gordura que o leite de vaca, esperam-se valores mais elevados no leite em pó de búfala do que os determinados pela legislação. Este apresentou média de 34,08% de matéria gorda, valor bem superior ao mínimo estipulado para o leite em pó de vaca. Ao verificar a qualidade do leite em pó de búfala por meio da legislação (BRASIL, 1997), foi possível constatar que o leite em pó apresentou boas características de qualidade, pois os parâmetros avaliados apresentaram valores dentro do esperado e se mantiveram constantes durante o tempo de armazenamento.

As altas temperaturas de secagem podem produzir alterações físicas e sensoriais indesejáveis no produto, o que ressalta a importância do controle do processo. Geralmente, estas alterações só são percebidas depois da reconstituição. Na prática, os fatores mais determinantes para as alterações negativas do produto são as temperaturas de entrada e saída

do ar de secagem. Os efeitos de altas temperaturas de secagem incluem a desnaturação das proteínas do soro e o aumento da insolubilidade do pó (WALSTRA et al., 2001).

### **5.3. Análise de microscopia eletrônica de varredura**

As partículas de leite em pó de búfala apresentaram aparência murcha e enrugada (Figura 1), que é geralmente formada devido à da temperatura utilizada no processo de secagem do leite. No presente trabalho, a temperatura utilizada no ar de entrada foi de 140°C e em dados encontrados na literatura a secagem do leite realizada em temperaturas próximas a esta (entre 140 e 145°C) promove este tipo de estrutura (KIM, CHEN & PEARCE, 2009; HAMMES et al., 2015). Segundo estudos realizados por Kim et al. (2009), os quais foram avaliados o efeito da temperatura (145 e 205°C) na partícula do leite em pó por meio da microscopia eletrônica de varredura, a utilização da temperatura de secagem de 205°C acelerou a velocidade de secagem das gotículas promovendo a formação rápida de uma crosta na superfície das partículas de leite em pó, o que fez com que a partícula de leite apresentasse uma aparência esférica e lisa. No entanto, quando a temperatura de secagem foi inferior (145°C), a partícula durante a secagem permaneceu úmida e flexível durante maior tempo, de modo que pôde esvaziar e enrugar à medida que arrefeceu, apresentando aparência murcha.

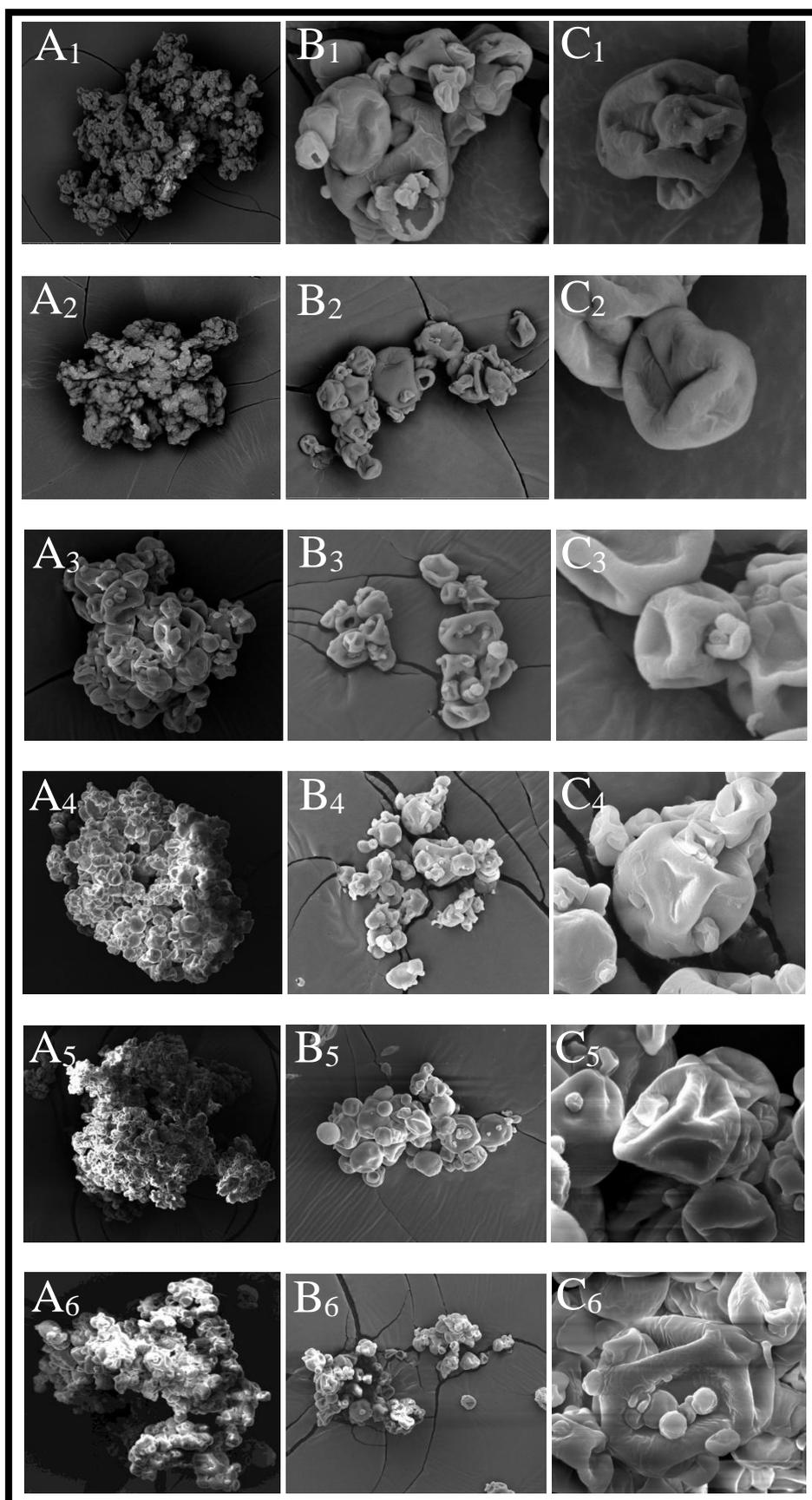
O mesmo foi observado por Hammes et. al (2015), que estudaram a influência da adição de lecitina de soja sobre a molhabilidade do leite em pó de búfala obtido por secagem por pulverização, onde as partículas de leite secas em temperatura de 140°C apresentaram aparência murcha e enrugada, aspecto característico de pós produzidos em temperaturas consideradas mais baixas.

Além da temperatura de secagem, o tamanho da gota produzido pelo bico atomizador também é responsável pelo aspecto liso ou enrugado dos pós, pois gotículas menores em temperaturas mais elevadas, por apresentarem maior área superficial, permitem uma evaporação mais rápida de água, sendo induzida, portanto, a formação de superfícies mais lisas. Por outro lado, em temperaturas mais baixas com gotículas maiores ocorre evaporação mais lenta de água e formação lenta da crosta na superfície da partícula, condição que permite a partícula esvaziar e murchar (NIJDAM & LANGRISH, 2006; KIM, CHEN & PEARCE, 2009).

Esta estrutura mais murcha e enrugada observada na amostra obtida de leite em pó de búfala foi sofrendo uma pequena alteração durante os tempos de análise (0 a 150 dias de estocagem). Na visualização das imagens da MEV (Figura 1) obtidas no tempo 0 pode-se perceber a maior presença de partículas mais murchas e à medida em que se aumentou o

tempo de armazenamento partículas mais esféricas e lisas foram sendo observadas, além de uma maior aglomeração das mesmas. Esta diferença na estrutura das partículas pode estar relacionada com a absorção de umidade que foi ocorrendo com avanço no tempo de armazenamento, quando a absorção de umidade provavelmente promoveu uma mudança na estrutura de algumas partículas, tornando-as estruturas mais esféricas e lisas.

Figura 1. Fotomicrografias obtidas por MEV das amostras de leite em pó búfala. A = aproximação de 1000x; B = aproximação de 3000x; C = aproximação de 20000x. Análises realizadas durante o tempo de armazenamento 1= tempo 0; 2= tempo 30; 3= tempo 60; 4=tempo 90; 5= tempo120 e 6= tempo 150.

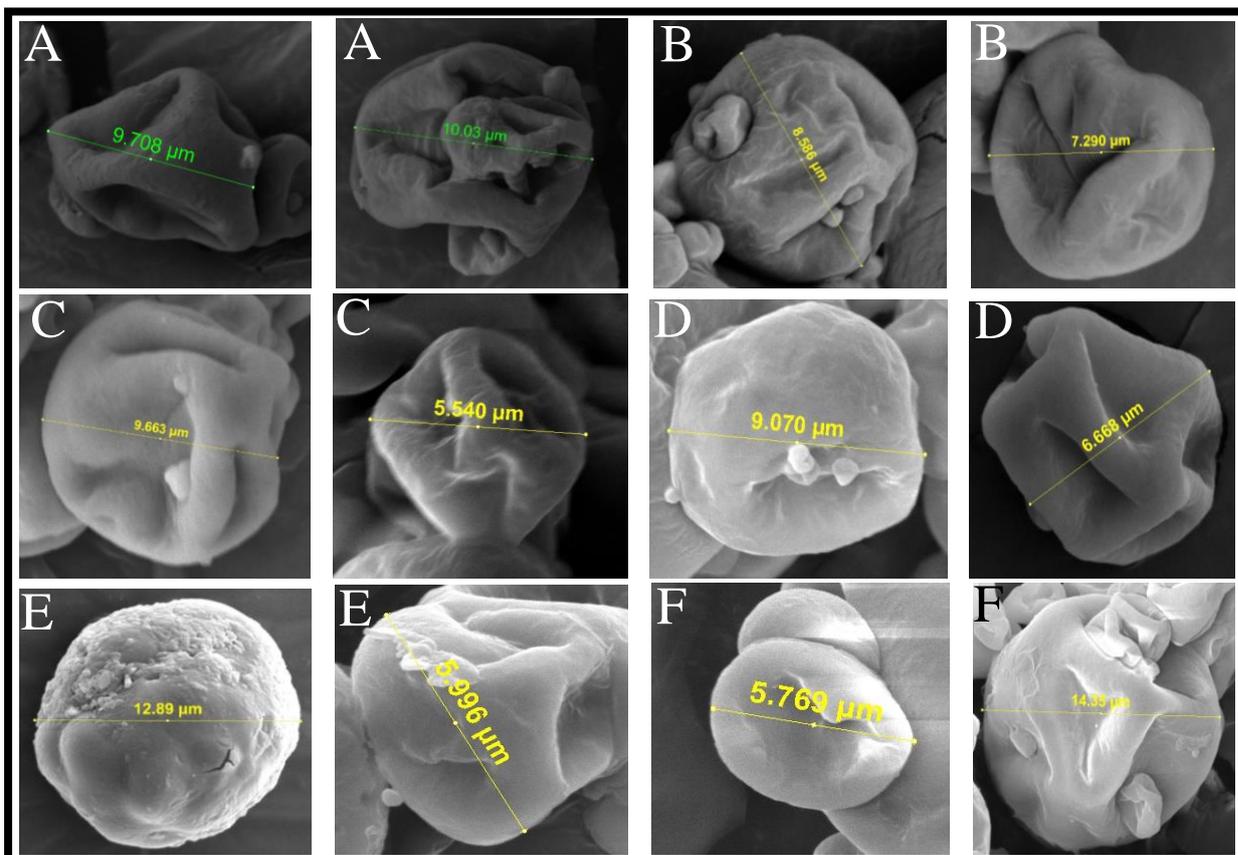


Cabe ressaltar que o leite em pó de búfala obtido apresentou partículas aglomeradas desde momento de sua obtenção (Figura 1). Esta aglomeração pode estar relacionada com a estrutura enrugada e murcha que as partículas apresentaram, pois neste caso, os componentes, principalmente a gordura, tem maior facilidade de migrar para a superfície da partícula, fazendo com que as propriedades de solubilidade (molhabilidade, dispersabilidade e capacidade de escoamento) sejam comprometidas podendo favorecer a aglomeração das partículas, oxidação e o desenvolvimento de rancidez no pó (HARDAS et al., 2000; KIM, CHEN & PEARCE, 2002).

Foster et al. (2009) destacam a lactose como a principal causa para a aglomeração do leite em pó, pois o leite em pó consiste de partículas esféricas de lactose amorfa contendo micelas de caseína incorporadas e glóbulos de gordura. A estrutura das partículas de pó é alterada quando a lactose amorfa sofre cristalização. Quando isso acontece, a proteína, minerais e gordura são excluídos da estrutura ordenada dos cristais de lactose e expelidos para a superfície do pó, provocando, portanto, o aumento da gordura livre. Os autores também destacam que se as temperaturas dessas partículas forem aumentadas durante o processo de secagem ou armazenamento, a gordura do leite pode acabar provocando a aglomeração, pois este processo pode provocar o derretimento da gordura formando ligações das partículas de gordura. Se a temperatura cai posteriormente, a gordura pode voltar a solidificar-se, resultando em um produto irregular e aglomerado.

Por outro lado, a aglomeração das partículas promove vantagens em relação à solubilidade do leite em pó. Alguns processos são realizados com o intuito de obter partículas de leite em pó aglomeradas como a fluidização e adição de lecitina para tornar o leite instantâneo e melhorar as propriedades de molhabilidade e capacidade de escoamento do leite em pó. Devido a essa característica (aglomeração) o leite em pó de búfala apresentou boa solubilidade, porém, no processo de obtenção do leite em pó de búfala não foram utilizados nenhum destes métodos, portanto essa aglomeração pode ter acontecido em decorrência dos fatores citados anteriormente, como temperatura das partículas na secagem, gordura livre presente na superfície do leite em pó e possível processo de cristalização da lactose. As imagens obtidas pela MEV (Figura 2) mostram que o leite em pó apresentou partículas de diferentes tamanhos que variaram em sua grande maioria entre 5 e 11  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

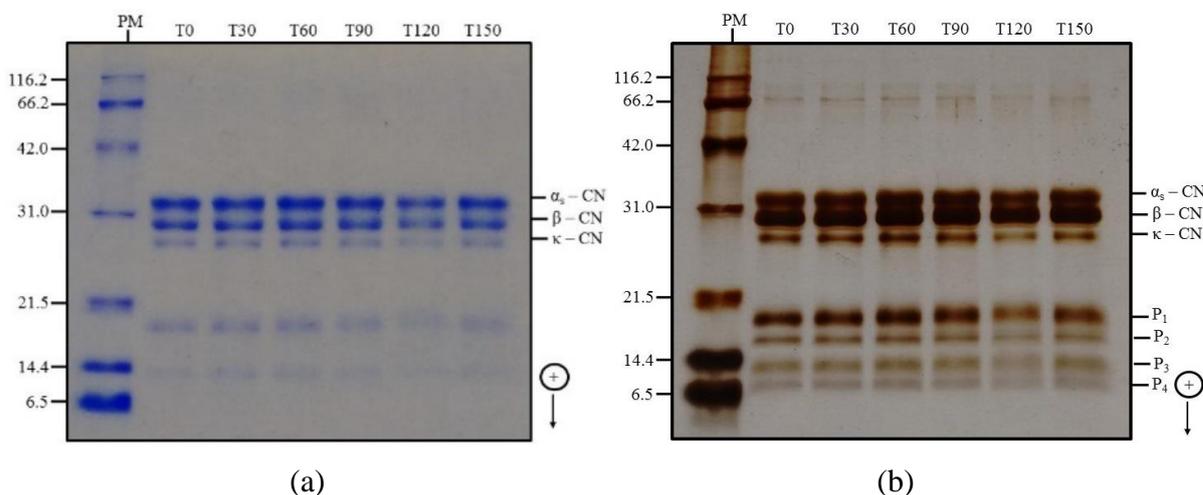
Figura 2. Fotomicrografias obtidas por MEV contendo o tamanho das partículas de leite em pó búfala. A, B, C, D, E e F correspondem a 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de estocagem respectivamente.



#### 5.4. Análise eletroforética

A partir da eletroforese, a qual foram separadas e identificadas as proteínas presentes no leite em pó de búfala, foi possível observar a diferença existente entre as frações de caseína durante o tempo de armazenamento. A mobilidade eletroforética das frações de caseína no gel de SDS-PAGE do leite em pó de búfala (Figura 3) revelou a migração de três bandas superiores com maior intensidade correspondendo à  $\alpha_s$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\kappa$ -caseína. As proteínas foram mais perceptíveis no gel revelado com Nitrato de Prata (Figura 3b), sendo possível visualizar a presença de outras bandas, provavelmente peptídeos formados por meio do processo de degradação das frações.

Figura 3. Perfil eletroforético (SDS-PAGE) das amostras de leite em pó de búfala. Gel revelado com Azul de Comassie (a); gel corado com Nitrato de Prata (b). Depositaram-se 20  $\mu$ g de proteínas em cada poço. PM: Marcador de massa molar; T: amostras nos tempos de análise (0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento);  $\alpha_s$ -CN:  $\alpha_s$ -caseína;  $\beta$ -CN:  $\beta$ -caseína;  $\kappa$ -CN:  $\kappa$ -caseína. P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>: peptídeos.



Não observou-se uma degradação acentuada das proteínas durante o tempo de estocagem, mesmo ocorrendo absorção de umidade nos últimos períodos de análise. Foi possível perceber que as bandas referentes à  $\alpha$  e  $\kappa$ - caseína sofreram uma pequena degradação denotado pela redução na intensidade de coloração destas bandas a partir do tempo de 120 dias de armazenamento. O processo de secagem, principalmente por spray dryer, pode induzir alterações nas proteínas (interação proteína-proteína e degradação) que influenciam na hidrofobicidade, solubilidade e desnaturação delas (KUROZAWA et al., 2009). O período de armazenamento e temperatura levam à polimerização da proteína e um decréscimo em solubilidade, tendo a temperatura e umidade relativa como fatores predominantemente envolvidos neste processo (GAIANI et al., 2007; SCHEIDEGGER et al., 2013).

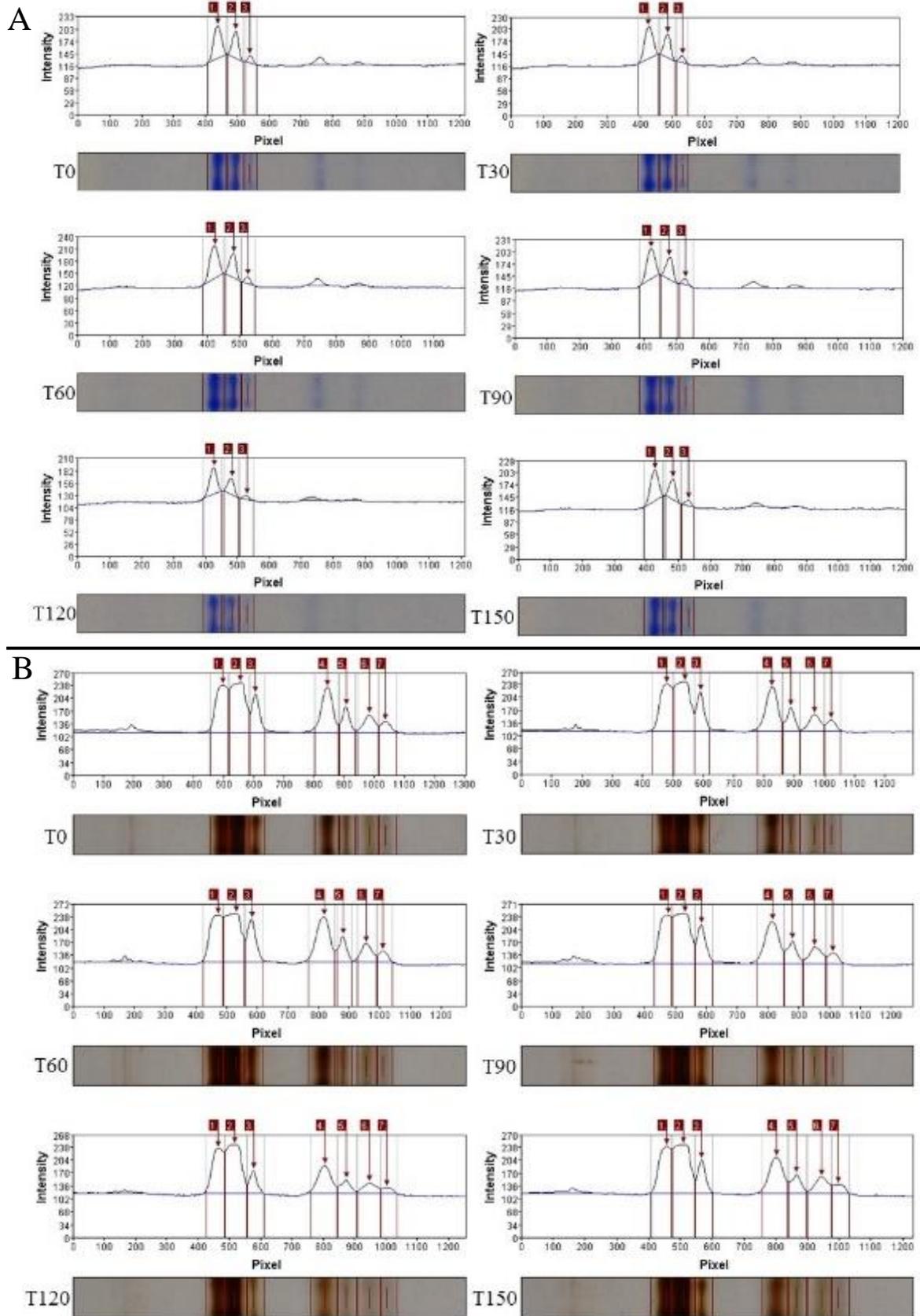
A perda de proteínas durante o aquecimento do leite é pequena devido à baixa umidade relativa durante o processo, à não exposição dos produtos a temperaturas excessivamente altas e ao pequeno tempo de duração do processo de aquecimento. Porém, durante o tempo de armazenamento a degradação das proteínas pode ser acentuada. A lisina, aminoácido envolvido na reação de escurecimento não enzimático, pode apresentar uma redução durante o armazenamento, redução esta que ocorre quando o leite permanece exposto à temperatura variando entre 25° e 37°C com valores de umidade mais elevados, promovendo a redução das proteínas no mesmo patamar.

Segundo Singh (2007) durante a secagem por pulverização, a desnaturação e agregação das proteínas provavelmente dependem da temperatura do ar em que o leite é pulverizado (temperatura do ar de entrada), o grau de concentração e a temperatura do concentrado antes da secagem, o tamanho das gotículas e a temperatura da mistura ar/pó que sai do secador (temperatura do ar de saída). A secagem é usualmente muito rápida e a temperatura das gotículas de leite não deve exceder à temperatura de 70°C durante a secagem. Assim, é preciso verificar a temperatura do ar de saída, pois este acaba sendo um parâmetro crítico e que deve ser controlado para evitar maiores danos causados pelo calor em produtos lácteos secos. A extensão da interação da proteína que ocorre durante o pré-aquecimento também afeta a solubilidade e a vida de prateleira do pó. Geralmente, o quanto maior o grau de desnaturação e agregação, menor a capacidade de solubilidade e menor será a estabilidade oxidativa do pó. A temperatura do ar de saída no secador se manteve em aproximadamente 80°C.

Além da degradação ocorrida no processo de secagem, esta degradação pode ter ocorrido também devido à presença de enzimas que com o tempo de armazenamento promovem a proteólise das frações proteicas. Egito et al. (2003) avaliaram a ação da plasmina na  $\beta$ -caseína presente no leite de égua e verificaram a presença da  $\gamma$ -caseína resultado da degradação da  $\beta$ -caseína. A plasmina hidrolisa principalmente a  $\beta$ -caseína e  $\alpha_{s2}$ -caseína e, em menor extensão,  $\alpha_{s1}$ -caseína, enquanto a  $\kappa$ -caseína é resistente à hidrólise por esta enzima.

Com os resultados obtidos da eletroforese foi realizada a quantificação das bandas de cada fração identificada nos géis corados com Azul de Comassie e Nitrato de Prata, por meio da análise densitométrica (Figura 4), identificando também o peso molecular de cada fração proteica ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína) e peptídeos formados pela degradação proteica.

Figura 4. Densitometria dos resultados obtidos por meio da eletroforese SDS-PAGE para os géis corados com Azul de Comassie (A) e Nitrato de Prata (B). (1º pico)  $\alpha$ -caseína; (2º pico)  $\beta$ -caseína; (3º pico)  $\kappa$ -caseína; (4º,5º,6º e 7º pico) peptídeos formados pela degradação das frações proteicas; tempos de armazenamento (T0, T30, T60, T90, T120 e T150).



No primeiro pico identificado pela densitometria, correspondente a  $\alpha$ -caseína, é possível observar sugestão de redução em seu tamanho no tempo de 120 dias de estocagem, isto fica mais evidente no gel corado com azul de Comassie. Esta redução indica que neste período ocorreu uma degradação desta fração proteica. No segundo pico correspondente a  $\beta$ -caseína, também é possível perceber essa redução no tamanho do pico formado durante o tempo de armazenamento. No terceiro pico correspondente a  $\kappa$ -caseína esta mesma observação pode ser feita.

Por meio dos picos encontrados na densitometria foram obtidas as áreas para cada fração identificada (Tabela 6), e realizada análise de regressão para verificar diferença estatística entre essas frações durante o tempo de armazenamento. Não foi possível ajustar equações de regressão para as frações, pois não existiu redução significativa até o período de 150 dias de estocagem. Por meio da análise do gel da eletroforese é possível observar uma degradação devido à redução na intensidade das bandas, mas estatisticamente essa degradação não foi significativa, portanto seria necessário analisar este leite por um período mais prolongado para detectar alterações significativas na degradação das proteínas.

Foi possível obter também, por meio da densitometria, o peso molecular das proteínas, determinado pela mobilidade de cada fração no gel em relação ao padrão de peso molecular. Proteínas maiores como a  $\alpha_{s1}$ -caseína apresentam maior dificuldade de mobilidade no gel devido ao tamanho dos poros formados, portanto esta apresenta maior valor de massa molecular (Tabela 6).

Tabela 5. Valores das áreas dos picos encontrados pela densitometria e peso molecular de cada fração proteica identificada na eletroforese SDS-PAGE

Frações proteicas	Áreas das frações do gel corado com azul de Comassie durante o tempo de armazenamento (dias)						PM (KDa)
	T0	T30	T60	T90	T120	T150	
alfa	2006	2029	1892	2081	808	1411	33
beta	1413	1215	1277	1421	525	1023	29
kappa	189	166	255	156	89	123	27
Frações proteicas	Áreas das frações do gel corado com nitrato de prata durante o tempo de armazenamento (dias)						PM
	T0	T30	T60	T90	T120	T150	
alfa	5900	5780	5358	5505	4826	4845	33
beta	8324	8282	8999	9168	8200	7836	29
kappa	3614	3009	3619	3434	2045	2336	27
pep 1	5217	4351	5178	5341	3564	3418	15
pep 2	2089	1490	1652	1936	1219	1178	12
pep 3	2056	1473	1815	1883	1228	1327	9
pep 4	1101	786	1052	1047	642	637	7

PM= peso molecular. KDa= quiloDalton.

## CONCLUSÕES

Foi possível obter leite em pó integral de búfala por meio da secagem em mini spray dryer, garantindo um produto com boas características de qualidade, mas com aumento significativo para umidade durante o tempo de armazenamento, o que não provocou alterações indesejáveis no produto.

As partículas do leite em pó de búfala por se apresentarem aglomeradas com estruturas murchas e enrugadas com pequenas alterações em sua estrutura durante o tempo de armazenamento.

A realização do estudo proteômico revelou que as frações proteicas não apresentaram diferença durante os 150 dias de armazenamento não ocorrendo, portanto, a degradação significativa das frações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCB. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS. Raças, 2012. Disponível em <http://w.bufalo.com.br/raças.html>. Acesso em: 20 de maio 2014.

ALVES, R. M. V.; JAIME, S. B. M.; ITO, D.; MOREIRA, C. Q. Influência das propriedades de barreira de embalagens flexíveis na estabilidade de leite em pó integral. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 1, p. 46-53, 2008.

ANEMA, S. G. The use of "lab-on-a-chip" microfluidic SDS-PAGE electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. **International Dairy Journal**, v.19, n.4, p.198-204, 2009.

AQUINO, L. F. M. C. **Estudo da fraude com soro de queijo em leite através das metodologias do ácido siálico livre, eletroforese SDS-PAGE e análise sensorial**. 2013, p. 75. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ.

ARAÚJO, T.P.M.; RANGEL, A.H.N.; SOARES, A.D.; LIMA, T.C.C.; LIMA JÚNIOR, D.M.; NOVAES, L.P. Influência das estações do ano sobre a composição do leite de búfalas mantido em tanque de resfriamento. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.7, n.1, p.1-5, 2011.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 5.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011. p. 601.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

BALDASSO, C. ; BARROS, T.C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381-386, 2011.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. **Food Powders: Physical properties, processing and functionality**. New York, Estados Unidos, Editora Springer Science & Business Media, 2005. p. 372.

BLOOM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RIISPOA. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília,DF, 1997. 154 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui o critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado "Índice CMP", de que trata a IN 68 de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 14 de dez 2006. Seção 1, n. 239. p. 8.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique I: Hardware and Process Parameters. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 2, p. 575-586, 2010.

CARMO, C. M. **Obtenção do shelf life em queijo mozzarella baseado na avaliação quantitativa e qualitativa dos grupos coliformes e estafilococos**. 2006, p. 91. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

CASTRO, L. A. S. **Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura**. Embrapa Clima Temperado. Documentos 93 versão online. Pelotas, ed. 1, 37p., 2001. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32390/1/documento-93.pdf> >. Acesso em: 18/05/2015.

SCHRÖDER, S.; ZHANG, H.; YEUNG, E. S.; JÄNSCH, L.; ZABEL, C.; WÄTZIG, H. Quantitative Gel Electrophoresis: Sources of Variation. **Journal of Proteome Research**, v.7, p.1226–1234, 2008.

DAMÉ, M. C. F. Búfalo: animal de tração. Embrapa Clima Temperado. Documentos 173 versão online. Pelotas, ed. 1, p.1-24, 2006. Disponível em: < [http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento\\_173.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_173.pdf) >. Acesso em: 06/06/2015.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] Editora: EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 60, 2007. Disponível em: < <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/microscopia/microscopia.pdf> >. Acesso em: 19/05/2015.

DINIZ, M. B.; LUIZ, L. V.; GONZAGA, M. M. M.; SZPOGANICZ, B.; FETT, R. Comportamento da beta-ciclodextrina adicionada ao leite de cabra submetido ao processo de desidratação por "spray dryer". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 197-201, 2005.

DUARTE, J.M.C. Efeitos ambientais sobre a produção no dia do controle e características físico-químicas do leite em um rebanho bubalino no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v.56, n.5, p.16-19, 2001.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E.; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite Caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 932-939, 2006.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações. São Paulo: **Nobel**, 2008, p. 555.

Embrapa. Disponível em <http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/baby/microsco.htm> **LOMicroscópioÓtico**. Acesso em: 10/05/2014.

FALEIRO, A. S. **Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia**. 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

FARREL JR, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.1641–1674, 2004.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**. v. 24, p. 336–340, 2010.

FIGUEIRA, P. T.; RAMOS, P.R.R.; ROÇA, R.O. Electrophoretic characterization of the muscle proteins of poultry. In: International Congress of Meat Science and Technology, 2012, Montreal. **International Congress of Meat Science and Technology**, 2012.

FIGUEIREDO, E. L.; LOURENÇO JR, J. B.; TORO, M. J. U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 04, n. 01: p. 19-28, 2010.

COSTA FILHO, M. H. B.; LIMA JR, D. M.; RANGEL, A. H. N.; SILVA, F. J. S.; NOVAES, L. P.; JÚNIOR, J. G. B. G.; SILVA, J. M. S.; MORENO, G. M. B. Sazonalidade e variação na qualidade do leite de búfalas no Rio Grande do Norte. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p.201-208, 2014.

FITZPATRICK, J. J.; HODNETT. M.; TWOMEY, M.; CERQUEIRA, P. S. M.; O'FLYNN, J.; ROOS, Y. H. Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. **Powder Technology**. v. 178, n. 2, p. 119-128, 2007.

FONG, B. Y.; NORRIS, C. S.; PALMANO, K. P. Fractionation of bovine whey proteins and characterisation by proteomic techniques. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 23-46, 2008.

FONSECA, C. R.; PORTO, E.; DIAS, C. T. S.; SUSIN, I. Qualidade do leite de cabra in natura e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 944-949, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. FAOSTAT: Agriculture data acesso em: 12/04/2014.

FOSCHIERA, J. L. Indústria de Laticínios: industrialização do leite, análises, produção de derivados. Porto Alegre: **Suliani Editografia Ltda**, p. 88, 2004.

FOSTER, K. D.; BRONLUND, J. E.; PATERSON, A. H. J. The contribution of milk fat towards the caking of dairy powders. **International Journal Dairy**. v. 15, n. 1, p. 85-91 2005.

FRANCO. G. **Tabela de composição Química dos alimentos**. 9 ed. Editora: Atheneu, São Paulo, 2007, 305p.

G. A. GelAnalyzer 2010a. Disponível em: < <http://www.gelanalyzer.com/index.html> >. Acesso em: 19/12/2015.

GAIANI, C., SCHUCK, P., SCHER, J., DESOBRY, S., E BANON, S. Dairy reidratação pó: Influência do estado proteíno, o modo de incorporação, e aglomeração. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 570-581, 2007.

GAIANI C.; SCHUCK P.; SCHER J.; EHRHARDT J. J.; ÁRABE-TEHRANY E.; JACQUOT M.; BANON S. Native phosphocaseinate powder during storage: Lipids released onto the surface. **Journal Food Engineering**, v. 94, p. 130-134, 2009.

TATTINI V. JR.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 129-136, 2006.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107 – 1121, 2007.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S.; PERES, J. R.; BARROS, L.; CEBALLO, P. P. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, p. 72, 2001.

GREPPI, A.; RANTSIOU, K.; PADONOU, W.; HOUNHOUGAN, J.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M.; COCOLIN, L. Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou by using culture-dependent and -independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 84–88, 2013.

GUIMARÃES, D.; CAPANEMA, L.; FREIRE, J.; JESUS JUNIOR, C.; SILVA, M. A. F.; SIDÔNIO, L. Análise de experiências internacionais e propostas para o desenvolvimento da cadeia produtiva brasileira do leite. **Agroindústria**. v. 38, p. 5-54, 2013.

HAHNE, L.C.C.; PASSOS, M.L. Estudo Experimental do Regime de Escoamento e da Aglomeração de Partículas no Sistema Vibro-fluidizado na Produção de Leite em Pó. In: **XXVIII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados – ENEMP 2000**, Teresópolis. Caderno de Resumos e Programação. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2000. v. 1.

HAMMES, A. M. V.; ENGLERTB, A. H.; NOREÑAC, C. P. Z.; CARDOZOA, N. S. M. Study of the influence of soy lecithin addition on the wettability of buffalo milk powder obtained by spray drying. **Powder Technology**. v. 277, p. 237–243, 2015.

HARDAS, N.; DANVIRIYAKUL, S.; FOLEY, J. L.; NAWAR, W. W.; CHINACHOTI, P. Accelerated stability studies of microencapsulated anhydrous milk fat. **LWT – Food Science and Technology**, v. 33, n. 7, p. 506-513, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. **SIDRA**. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/> >. Acesso em: 20/07/2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção e Venda de leite de búfala no ano nos estabelecimentos agropecuários por condição do produtor em relação às terras, grupos de cabeças, grupos de atividade econômica e grupos de área total. Censo agropecuário 2006. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ca/default.asp?z=p&o=2#8> > . Acesso em: 20/12/2015.

- JORGE, A. M.; COUTO, A.G.; CRUDELI, G. A.; PATIÑO, E.M. Produção de búfalas de leite. Botucatu: **FEPAF**, p. 181, 2011.
- KELLY, J.; KELLY, H. M.; HARRINGTON, D. Influence of processing variables on the physicochemical properties of spray dried fat-based milk powders. **Lait**, v. 82, n. 4, p. 401-412, 2002.
- KIM E. H. J.; CHEN X. D.; PEARCE D. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 3. Changes in the surface composition during long-term storage. **Journal Food Engineering**, v. 94, n. 2, p. 182–191, 2009.
- KIM, E. H. J.; CHEN, X. D.; PEARCE, D. Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 26, n. 3, p. 197–212, 2002.
- KUROZAWA, L. E.; MORASSI, A. G.; VANZO, A. A.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. **Drying Technology**, v. 27, p. 1248-1257, 2009.
- MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 3, 2001.
- MACHADO, A. R. T.; CAMPOS, J. E. C.; CLARETO, S. S.; MORAES, A. L. L. Características físico-químicas e sensoriais de três marcas de leite de vaca pasteurizado e comercializado na cidade de Alfenas-MG. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 2, p. 93-99, 2014.
- KREY, T.; SOUZA, C. F. V. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral produzido numa indústria da região do vale do taquari – rs. **Interbio**, v.3, n.2, p. 8, 2009.
- MANSO, M. A.; LEONIL, J.; JAN, G.; GAGNAIRE, V. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. **International Dairy Journal**. v. 15, p. 845-855, 2005.
- MARQUES, J. R. F. Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Belém: Tecnologia**, v. 1, p. 16-2, 2000.
- MARQUES, L.G.; FREIRE, J.T. Analysis of Freeze-Drying of Tropical Fruits. **Drying Technology**, v. 23, p. 2169-2184, 2005.
- MARQUES F. M.; SÁ J.F. O.; SANTOS M. C.; MARTINS M.F.; FURTADO M.A.M. Caracterização de leite em pó, soro de leite em pó e suas misturas por eletroforese em gel de poli(acrilamida). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 473-9, 2011.
- MARTINHAGO, F. M.; STEFFEN, W. F.; GUIMARÃES, T. R.; ALVES, C. B.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. de; "avaliação da viabilidade celular e produção de poli (3-hidroxibutirato) de *Cupriavidus necator* após liofilização utilizando leite desnatado como crioprotetor", p. 2252-2259 . In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia**

**Química - COBEQ 2014** [= **Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2**]. São Paulo: Blucher, 2015.

MEDEIROS, U.K.L.; MARCIANO, L.A.; NASCIMENTO, R.J.A.; PASSOS, M.L.; MEDEIROS, M.F.D. Estudo da Higroscopicidade do Leite de Cabra em Pó Produzido na Secagem do Leite de Jorro, com Partículas de Polipropileno e Avaliação das Propriedades Físicas do Leite Reconstituído. **Alimentacion Ciencia e Ingenieria**, v. 16, p. 249-250, 2010.

MEDEIROS, K. C.; DEODATO, J. N. V.; MARTINS, S. S.; SEVERO, D. S.; ARAÚJO, A. S. Qualidade de leite em pó integral comercializados em Pombal – PB. **Revista Verde**, v. 9, n. 4, p. 50 - 52, 2014.

MURRIETA-PAZOS I.; GAIANI C.; GALET L.; CALVET R.; CUQ B.; SCHER J. Food powders: Surface and form characterization revisited. **Journal of Food Engineering**. v. 112, p. 1–21, 2012.

NADAL, M.R. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 756-763, 2007.

NARDI JUNIOR, G; SANTOS, E.B. Evolução da produção leiteira do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 216-217, 2013.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. J. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 919-925, 2006.

OLIVEIRA, A. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético, **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.122-134, 2005.

PARK, K.O. Proteomic studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v.37, p.133-138. 2004.

PATEL, R.P.; PATEL, P.M.; SUTHAR, M.A. Spray drying technology: an overview. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 10, p. 44-47, 2009.

PEIGHAMBARDOUST, S. H.; TAFTI, A. G.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in food science & technology**. v. 22, p. 215-224, 2011.

PERIN, L. M.; MORAES, P. M.; MICHELLE VIEIRA ALMEIDA, M. V. A.; NERO, L. A. Interferência de temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicrotrófica, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 333-342, 2012.

PIGNATA, M. C.; FERNANDES, S. A. A.; FERRÃO, S. P. B.; FALEIRO, A. S.; CONCEIÇÃO, D. G. Estudo comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 226 – 233, 2014.

PRINN, K. B.; CONSTANTINO, H. R.; TRACY, M. Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, p. 1-4, 2002.

PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; FRIGGI, C. A.; MUNARETTO, J. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**. v.36, n.5, p. 697-710, 2013.

QUEIROGA, R. C. R. E.; CAMBUIM, R. B.; OLIVEIRA, M. E. G.; VIANNA, R. P. T.; SOUZA, E. L. Microbiological and physicochemistry quality of pasteurized type C milk distributed by the “Milk of Paraíba” program. **Journal of the Brazilian Society for Food and Nutrition**, v. 35, n. 1, p. 97-109, 2010.

REH, C.; BHAT, S. N.; BERRUT, S. Determination of water content in powdered milk. **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 457-464, 2004.

RIBEIRO, E. P.; ELISENA, A.G. S. **Química de Alimentos**. 2ª ed – São Paulo: Editora Blucher, 2007.

ROCHA, T. L. **Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Comunicado Técnico da Embrapa nº 136. Brasília – DF. Outubro, 2005.

RODRIGUES, C.F.C.; IAPICHINI, J.E.C.B.; LISERRE, A.M.; SOUZA, K. B.; FACHINI, C.; REICHERT, R.H. Oportunidades e desafios da bubalinocultura familiar da região sudoeste paulista. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**. p.100-109, 2008.

RONCADA, P.; PIRAS, C.; SOGGIU, A.; TURK, R.; URBANI, A.; BONIZZU, L. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4259-4274, 2012.

ROSATI, A.; VAN VLECK, L.D. Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production in the italian river buffalo population. **Livestock Production Science**. v.74, n.2, p.185-190, 2002.

SANTIAGO, A. A. Introdução dos Búfalos no Brasil. **Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos**, 13p. 2000. Disponível em: <  
[http://www.bufalo.com.br/info\\_criador/historico\\_bufalos.pdf](http://www.bufalo.com.br/info_criador/historico_bufalos.pdf)>. Acesso em: 05/08/2015.

SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA nº 24 de 01 de agosto. 1994: Dispõe sobre as normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal. Cap.7, Artigo 134. 1994. Disponível em <  
<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/?row=34#>>. Acesso em 28/07/2015.

SILVA, R. S.; SOUZA, C. R. B. Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas totais de folhas e raízes de *Piper tuberculatum*. **Acta Amazonica**. v.39 n.2, 2009.

SINGH, H. Interactions of milk proteins during the manufacture of milk powders. **Le Lait**, v. 7, p.413-423, 2007.

SCHEIDEGGER, D.; RADICI, P. M.; VERGARA-ROIG, V. A.; BOSIO, N. S.; PESCE, S. F.; PECORA, R. P.; ROMANO, J. C. P.; KIVATINITZ, S. C. Evaluation of milk powder quality by protein oxidative modifications. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3414–3423, 2013.

SCHUCK, P. Spray drying of dairy products: state of the art. **Lait**, Le Ulis, v. 82, p. 375-382, 2002.

SCHUCK, P.; DOLIVET, A.; MÉJEAN, S.; HERVÉ, C.; JEANTET, R. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. **International Dairy Journal**, v.31, n.1, p.12-17, 2013.

SHELKE, S. K.; THAKUR, S. S.; AMRUTKAR, S. A. Effect of feeding protected fat and proteins on milk production, composition and nutrient utilization in Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, p. 98-107, 2012.

SOUZA, C.R.F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* pelos processos spray dryer e leite de jorro**. 2003. p. 182. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

STEPHAN, M. P. Estudos iniciais de utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para avaliação de fraude em produtos comercializados como concentrado de soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.61, n.351, p.214-217, 2006.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de Búfala na Indústria de Produtos Lácteos. **Revista Brasileira de Produção Animal**, v. 29, n. 2, p. 96-100, 2005.

TERRONI, H. C.; JESUS, J. M.; ARTUZO, L. T.; VENTURA, L. V.; SANTOS, R. F.; DAMY-BENEDETTI, P. C. Liofilização. **Revista científica UNILAGO**. v1, p. 271-284, 2013.

THOMAS, M. E. C.; SCHER, J.; DESOBRY-BANON, S.; DESOBRY, S. Dehydrated Dairy Products Milk Powder: Physical and Functional Properties of Milk Powders. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p.297-322, 2004.

THOMSEN, M.K.; LAURIDSEN, L.; SKIBSTED, L. H.; RISBO, J. Two types of radicals in whole milk powder, effect of lactose crystallization, lipid oxidation and browning reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1805-1811, 2005.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M.F.C.; OLIVEIRA, J.A. Parâmetros genéticos para produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.2051-2056, 2000.

VIEIRA, J.N.; TEIXEIRA, C. S.; KUABARA, M. Y.; OLIVEIRA, D. A. A. Bubalinocultura no Brasil: Short communication. **PUBVET**, v. 5, n. 2, p. 9, ed. 149, art. 1003, 2011.

VIEIRA, A. P.; NICOLETI, J. F.; TELIS, V. R. N. Liofilização de fatias de abacaxi: avaliação da cinética de secagem e da qualidade do produto. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.1, p.50-58, 2012.

VISSOTTO, F. Z.; MONTENEGRO, F. M.; SANTOS, J. M.; OLIVEIRA, S. J. R. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Food Science and Technology**. v.26, n.3, p. 666-671, 2006.

XIONG, Y. L.; GOWER, M. J.; LI, C.; ELMORE, C. A.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M.D. Effect of dietary ropamine on tenderness and postmortem protein degradation of pork muscle. **Meat Science**, v.73, n.4, p.600-604, 2006.

YAMADA, M.; MURAKAMI, K.; WALLINGFORD, J. C.; YUKI, Y. Identification of low abundance proteins of bovine colostral and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1153-60, 2002.

WALSTRA, P. **Ciência de la leche y tecnología de los productos lácteos**. 6.ed. Zaragoza: Acribia, p. 730, 2001.

WHETSTINE, M. E. C.; DRAKE, M. Flavor of Dairy Products. **ACS Symposium Series**, v. 971, n. 13, p 217–251, 2009.

WU, W.W.; WANG, G.; BAEK, S.J.; SHEN, R.F. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. **Journal of Proteome Research**. v. 5, p. 651-658, 2006.