

FTIR COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DE PROTEÍNAS DO LEITE CRU

Leticia Knakiewicz^{1*};

¹Núcleo de Ciência, Tecnologia e Inovação do Leite (NCTI)/Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Medianeira, Paraná, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/5704842454118238>.

Larissa Karla Monteiro²;

²Núcleo de Ciência, Tecnologia e Inovação do Leite (NCTI)/Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Medianeira, Paraná, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/6575243577701104>.

Mariane Wolf³;

³Núcleo de Ciência, Tecnologia e Inovação do Leite (NCTI)/Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química (DEAQ), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/8711783303286696>.

Andréia Zilio Dinon⁴.

⁴Núcleo de Ciência, Tecnologia e Inovação do Leite (NCTI)/Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química (DEAQ), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil.

<http://lattes.cnpq.br/3603845531003036>.

RESUMO: O leite é composto por proteínas, lipídios, lactose e minerais, cujas interações estruturais podem ser modificadas por tratamentos térmicos. O aquecimento pode induzir alterações conformacionais, especialmente nas proteínas, favorecendo processos de desnaturação, por exemplo. Nesse contexto, técnicas espectroscópicas têm sido utilizadas para investigar modificações estruturais na composição do leite de forma rápida e não destrutiva. Logo, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito de diferentes condições de temperatura sobre a fração proteica do leite cru utilizando a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier acoplada à reflectância total atenuada (ATR-

FTIR). Os espectros foram obtidos na região de 4000–500 cm^{-1} , permitindo a identificação de bandas associadas aos principais constituintes do leite. As principais variações espectrais foram observadas na região da Amida I, com destaque para a banda em 1637 cm^{-1} , indicando alterações na estrutura secundária das proteínas. De forma geral, os resultados indicam que temperaturas superiores a 60 °C promovem alterações estruturais mais evidentes nas proteínas, enquanto temperaturas inferiores a esse valor tendem a preservar melhor a estabilidade proteica. Além disso, o estudo destaca o potencial da ATR-FTIR como ferramenta analítica para o monitoramento de modificações estruturais induzidas pelo aquecimento no leite cru.

PALAVRAS-CHAVE: Leite bovino. Tratamento térmico. Estabilidade proteica. Desnaturação.

FTIR AS A TOOL FOR EVALUATING THE THERMAL STABILITY OF RAW MILK PROTEINS

ABSTRACT: Milk is composed of proteins, lipids, lactose, and minerals, whose structural interactions can be modified by thermal treatments. Heating may induce conformational changes, especially in proteins, favoring processes such as denaturation. In this context, spectroscopic techniques have been used to investigate structural modifications in milk composition in a rapid and non-destructive manner. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of different temperature conditions on the protein fraction of raw milk using Fourier Transform Infrared Spectroscopy coupled with Attenuated Total Reflectance (ATR-FTIR). The spectra were obtained in the 4000–500 cm^{-1} region, allowing the identification of bands associated with the main milk constituents. The main spectral variations were observed in the Amide I region, with emphasis on the band at 1637 cm^{-1} , indicating changes in the secondary structure of proteins. In general, the results indicate that temperatures above 60 °C promote more evident structural changes in proteins, while temperatures below this value tend to better preserve protein stability. Furthermore, the study highlights the potential of ATR-FTIR as an analytical tool for monitoring heat-induced structural modifications in raw milk.

KEY-WORDS: Bovine milk. Thermal treatment. Protein stability. Denaturation.

INTRODUÇÃO

O leite é reconhecido como um alimento de elevada importância nutricional, tecnológica e econômica, sendo amplamente consumido em diferentes regiões do mundo e utilizado como matéria-prima para uma grande variedade de produtos lácteos. Sua composição é composta por proteínas, lipídios, lactose, minerais, vitaminas e diversos compostos bioativos, que contribuem tanto para o valor nutricional quanto para as propriedades físico-químicas e funcionais do alimento (CIMMINO et al., 2023).

Entre esses constituintes, as proteínas do leite desempenham um papel crucial na qualidade nutricional e nas características tecnológicas do leite e de seus derivados, influenciando propriedades como a estabilidade térmica, a capacidade de emulsificação, a formação de gel e a retenção de água (ABUBAKER et al., 2026). Essas proteínas são tradicionalmente classificadas em dois grandes grupos: caseínas e proteínas do soro. As caseínas representam aproximadamente 80% do conteúdo proteico do leite e estão organizadas em estruturas supramoleculares denominadas micelas de caseína, formadas principalmente pelas frações α_1 , α_2 , β e κ -caseína. Já as proteínas do soro correspondem a cerca de 20% das proteínas totais, sendo compostas majoritariamente por β -lactoglobulina, α -lactalbumina, lactoferrina e imunoglobulinas (LIN et al., 2021).

Durante o processamento industrial do leite e de produtos lácteos, a aplicação de tratamentos térmicos é uma etapa essencial para garantir a segurança microbiológica, inativar enzimas indesejáveis e aumentar a vida útil dos produtos (HAYES et al., 2025). No entanto, a exposição ao calor pode induzir alterações significativas na estrutura e nas interações moleculares dos componentes do leite, especialmente no sistema proteico. As proteínas do soro, em particular, apresentam maior sensibilidade ao aquecimento, podendo sofrer desnaturação, agregação e interações com micelas de caseína, fenômenos que podem resultar em modificações estruturais e funcionais do sistema proteico (LI et al., 2021).

Nesse contexto, o emprego de técnicas analíticas capazes de monitorar alterações estruturais e composicionais no leite tem se tornado cada vez mais relevante. Entre essas abordagens, as técnicas espectroscópicas destacam-se por possibilitar análises rápidas, com preparação reduzida de amostras e sem necessidade de reagentes químicos. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido amplamente utilizada para investigar a composição do leite e detectar modificações estruturais em seus componentes, permitindo a identificação de bandas espectrais características associadas a grupos funcionais presentes em proteínas, lipídios e carboidratos.

Dentre as diferentes configurações dessa técnica, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier acoplada à reflectância total atenuada (ATR-FTIR) apresenta vantagens adicionais, como rapidez analítica, caráter não destrutivo e mínima necessidade de preparo de amostra, o que a torna especialmente adequada para análises de rotina e para o monitoramento de alterações estruturais em proteínas do leite induzidas por tratamentos térmicos (HAYES et al., 2025).

OBJETIVO

Avaliar o efeito de diferentes condições de temperatura na fração proteica do leite cru, utilizando a espectroscopia ATR-FTIR como ferramenta para identificar possíveis alterações estruturais nas proteínas.

METODOLOGIA

Preparo das amostras

Amostras de leite cru fresco foram coletadas diretamente de um tanque de armazenamento de uma propriedade leiteira localizada no município de Serra Alta, Santa Catarina, Brasil. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração a aproximadamente 4 °C até o momento das análises. As amostras foram submetidas à homogeneização por 5 minutos em placa de agitação magnética (IKA C-MAG HS 7), sem aquecimento, a fim de garantir a uniformidade da matriz antes da realização dos ensaios experimentais.

Tratamento térmico

Após a etapa de homogeneização, o leite foi fracionado em alíquotas de 30 mL, as quais foram submetidas a tratamentos térmicos em banho-maria, previamente estabilizado, nas temperaturas de 25 (controle), 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C. Cada amostra permaneceu à respectiva temperatura por 3 minutos, visando avaliar o efeito do aquecimento sobre a composição do leite. Após o aquecimento, cada amostra foi imediatamente imersa em um banho de gelo, até atingir a temperatura ambiente de 25 °C.

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada

As análises foram realizadas em um espectrômetro Spectrum Two (PerkinElmer, Estados Unidos), acoplado a um acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de diamante. Os espectros foram registrados na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por amostra. As leituras foram realizadas à temperatura ambiente (~20 °C). Todas as amostras foram lidas em triplicata.

Análise dos Dados

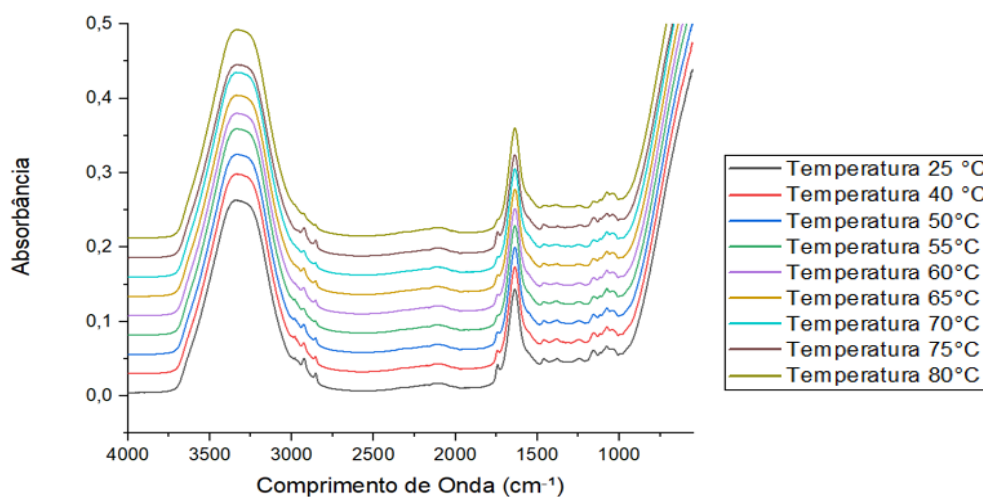
O processamento e a análise dos espectros foram realizados utilizando o software OriginPro 2024b (OriginLab, EUA) incluindo a organização dos dados, tratamento espectral e geração dos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo, investigou-se a influência da temperatura na estrutura das proteínas presentes no leite cru ao longo de um intervalo de tempo determinado. A Figura 1 apresenta os espectros médios obtidos para as diferentes faixas de temperatura analisadas, na região espectral de 4000 a 500 cm^{-1} . De modo geral, os espectros evidenciam variações na

intensidade e no perfil de algumas bandas características, indicando possíveis modificações estruturais nos componentes do leite associadas ao aumento da temperatura.

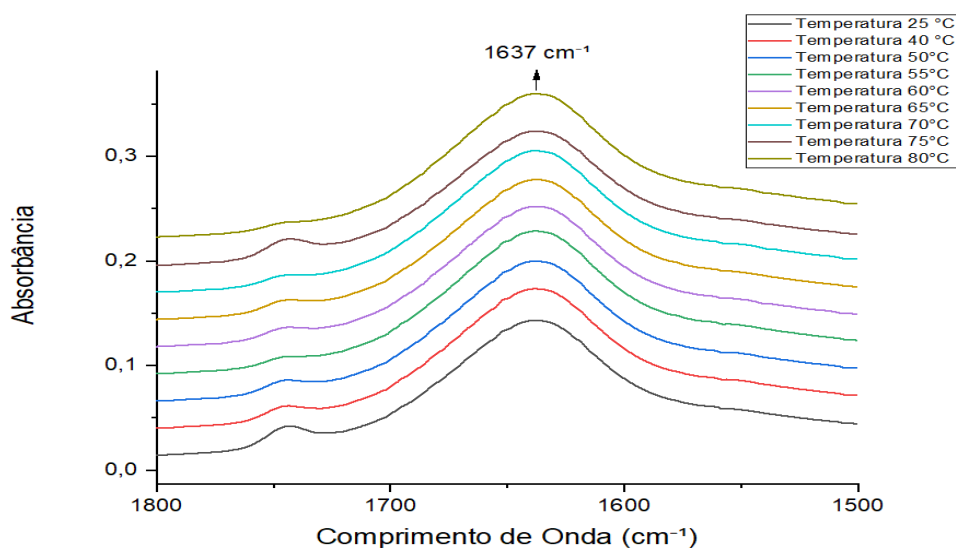
Figura 1. Espectros FTIR médios das amostras de leite cru em diferentes temperaturas.



Fonte: Autores, 2026.

Uma banda de interesse para a identificação de proteínas é a da região entre 1700 e 1600 cm^{-1} . Essa região corresponde à banda de amida I (Figura 2), predominantemente associada às vibrações de estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ (HAYES et al., 2025). Modificações nessa região espectral estão associadas a alterações na estrutura secundária das proteínas (GREWAL et al., 2018; ANDRADE et al., 2019).

Figura 2. Espectros FTIR médios das amostras de leite cru em diferentes temperaturas na região da amida I (1700-1600 cm^{-1})



Fonte: Autores, 2026.

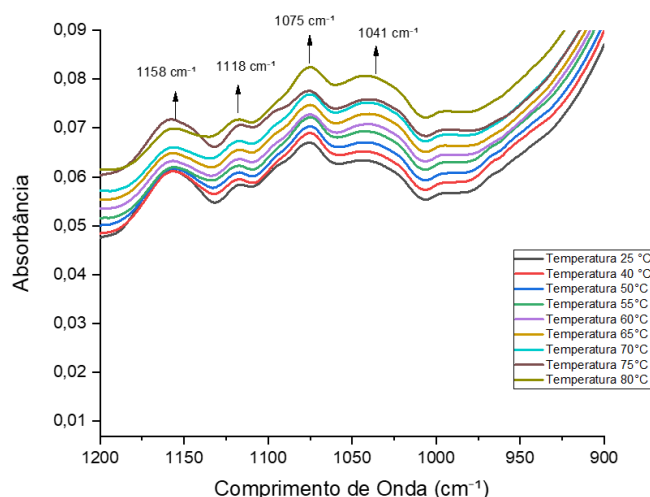
As variações nos espectros (Fig.2) são frequentemente relacionadas às proteínas do soro do leite, que apresentam estrutura mais organizada e, conseqüentemente, menor estabilidade térmica. Os resultados das análises de FTIR obtidos no presente estudo também confirmam que a exposição ao tratamento térmico, dependendo da intensidade aplicada, pode promover a desnaturação das proteínas do soro e alterar a estabilidade das micelas de caseína, resultando em alterações na organização estrutural dessas proteínas (MARKOSKA et al., 2019).

Foi possível observar um pico na banda de 1637 cm^{-1} (Fig. 2), que apresentou aumento de intensidade com o aumento da temperatura em todas as amostras avaliadas. Esse pico é característico de estruturas do tipo folhas β , sugerindo que o aquecimento promoveu alterações na estrutura secundária das proteínas, possivelmente associadas à desnaturação da β -lactoglobulina, uma das principais proteínas do soro do leite (MATSARSKAIA et al., 2020).

Resultados semelhantes foram relatados por Hayes et al. (2025), que avaliaram leite desnatado e observaram diminuição da banda na região de 1624 cm^{-1} . Entretanto, os autores apresentaram os espectros em transmitância, o que é consistente com os resultados observados neste estudo, uma vez que reduções na transmitância correspondem a aumentos na absorbância.

Além disso, a região espectral entre 900 e 1200 cm^{-1} é fundamental para a caracterização do leite, pois abriga as bandas de absorção dos carboidratos e do conteúdo mineral. Esta faixa é especialmente utilizada para monitorar as interações entre proteínas e componentes minerais sob diferentes condições de processamento. Conforme demonstrado na Figura 3, o aquecimento de amostras de leite promove um aumento progressivo na intensidade dos picos em 1158 , 1118 , 1075 e 1041 cm^{-1} .

Figura 3. Espectros FTIR médios das amostras de leite cru em diferentes temperaturas na região dos carboidratos e minerais ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$)



Fonte: Autores, 2026.

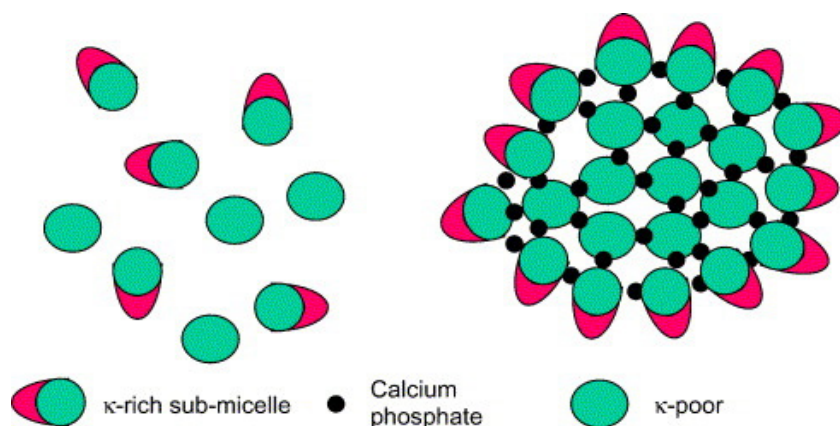
Os picos em 1158, 1118 e 1041 cm^{-1} são frequentemente associados à identificação de carboidratos presentes no leite, principalmente à lactose. Embora a lactose apresenta maior estabilidade térmica, alterações na intensidade dessas bandas podem ocorrer em função de mudanças no ambiente molecular da matriz do leite, decorrentes da desnaturação das proteínas e das modificações nas interações entre seus constituintes, como diferentes proteínas, carboidratos e minerais (MARKOSKA et al., 2019).

O pico em 1075 cm^{-1} é um marcador específico da ligação do fosfato à micela de caseína. O aumento observado na absorção durante o aquecimento reflete a redução da solubilidade do cálcio e do fosfato inorgânico na fase sérica, o que induz a migração e a fixação desses íons nas micelas de caseína (JAISWAL et al., 2015). Observa-se que mais de 60% do cálcio presente no leite está conjugado à caseína, e o aumento da temperatura faz com que isso ocorra ainda mais (DUMPLER et al., 2020). Assim, o cálcio e o fósforo possuem influência direta na estabilidade térmica do leite.

As micelas de caseína são estruturas coloidais organizadas, cuja arquitetura pode ser descrita por modelos estruturais, como o modelo nuclear. Nesse modelo, as micelas são formadas por agregados de submicelas compostas por diferentes frações proteicas (α 1-, α 2- e β -caseína), estabilizadas principalmente por interações hidrofóbicas e por ligações com fosfato de cálcio coloidal. A κ -caseína encontra-se predominantemente na superfície, formando uma camada altamente hidratada responsável pela estabilização estérica e pela manutenção das micelas em suspensão.

Conforme ilustrado na Figura 4, a organização dessas interações é fundamental para a estabilidade estrutural das micelas. Sob tratamento térmico, alterações nessas forças intermoleculares podem levar à desestabilização do sistema, promovendo a reorganização estrutural e a agregação proteica. Essas mudanças podem ser monitoradas por FTIR, especialmente na região de amida I, evidenciando variações nas estruturas das proteínas.

Figura 4. Estrutura da micela de caseína



Fonte: Horne, 2006.

Em geral, observa-se que o aumento da temperatura promove alterações estruturais nas proteínas do leite. Entre 25 e 50 °C, os espectros apresentam perfis bastante semelhantes, com variações discretas na intensidade e no formato das bandas características (Fig. 1 e 2). Esse comportamento indica que, nessa faixa de temperatura, a estrutura conformacional das proteínas permanece majoritariamente preservada, sugerindo que as interações responsáveis pela estabilidade estrutural ainda não foram significativamente afetadas pelo aquecimento.

A partir de 55–60 °C, passam a ser observadas alterações mais perceptíveis em regiões associadas às proteínas, especialmente na banda de Amida I (Fig. 2). Essas mudanças indicam o início de processos de reorganização estrutural, resultantes do enfraquecimento de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Algumas proteínas do soro, como a albumina sérica e a lactoferrina, apresentam menor estabilidade térmica e iniciam a desnaturação a temperaturas próximas de 60 °C (MATSARSKAIA et al., 2020).

Na faixa de 65–70 °C, as modificações espectrais tornam-se mais evidentes, indicando alterações mais pronunciadas na estrutura proteica. Esse comportamento está associado à desnaturação térmica da β -lactoglobulina, principal proteína do soro do leite. Durante esse processo ocorre a ruptura de interações intramoleculares que estabilizam a estrutura nativa desta proteína. Com o aumento da temperatura, porções hidrofóbicas da β -lactoglobulina tornam-se acessíveis, favorecendo interações intermoleculares e intramoleculares que levam à formação de agregados proteicos. Esse fenômeno pode estar associado à menor estabilidade térmica da proteína (LI et al., 2021).

Em temperaturas mais elevadas, entre 75 e 80 °C, as alterações espectrais tornam-se ainda mais intensas, sugerindo um estágio mais avançado de modificação estrutural. Nessa faixa de temperatura, a desnaturação proteica favorece a formação de agregados proteicos, resultantes de interações hidrofóbicas e ligações dissulfeto entre proteínas do soro e as caseínas (MARKOSKA et al., 2019), o que modifica significativamente a organização estrutural do sistema proteico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações estruturais nas proteínas do leite foram investigadas em diferentes faixas de temperatura por meio de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier associada à refletância total atenuada (ATR-FTIR).

A análise comparativa dos espectros obtidos sob distintas condições térmicas demonstrou que o aumento da temperatura promove modificações progressivas na organização estrutural dos constituintes do leite, particularmente nas proteínas do soro. Essas alterações estão associadas a mudanças conformacionais na estrutura secundária das proteínas, refletidas por variações nas bandas características da região de amida I

(1700-1600 cm^{-1}).

De modo geral, verificou-se que temperaturas superiores a 65 °C induzem alterações estruturais mais pronunciadas nas proteínas do leite, sugerindo a ocorrência de processos de desnaturação térmica. Assim, considerando a preservação da integridade estrutural e da estabilidade proteica, temperaturas iguais ou inferiores a 60 °C podem ser consideradas mais adequadas para minimizar tais alterações.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio no Projeto FAPESC 2024TR002108, ao Núcleo de Ciência, Tecnologia e Inovação do Leite (NCTI) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

REFERÊNCIAS

ABUBAKER, Mohamed Aamer et al. **Recent advances in the application of polysaccharides to enhance the functional properties and extend the shelf life of milk proteins: A review.** Food Chemistry: X, v. 34, n. 103584, p. 103584, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2026.103584>.

ANDRADE, Jonathan et al. **FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration.** LWT Food Science and Technology, v. 99, p. 166–172, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079>.

CIMMINO, F. et al. **Invited review: Human, cow, and donkey milk comparison: Focus on metabolic effects.** Journal of Dairy Science, v. 106, n. 5, p. 3072–3085, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22465>.

DUMPLER, Joseph; HUPPERTZ, Thom; KULOZIK, Ulrich. **Invited review: Heat stability of milk and concentrated milk: Past, present, and future research objectives.** Journal of Dairy Science, v. 103, n. 12, p. 10986–11007, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18605>.

GREWAL, Manpreet Kaur; HUPPERTZ, Thom; VASILJEVIC, Todor. **FTIR fingerprinting of structural changes of milk proteins induced by heat treatment, deamidation and dephosphorylation.** Food Hydrocolloids, v. 80, p. 160–167, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.010>.

HAYES, Elena et al. **Real-time measurement of heat stability of skim milk using attenuated total reflectance (ATR)-FTIR spectroscopy.** International Journal of Dairy Technology, v. 78, n. 1, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13156>.

HORNE, David S. **Casein micelle structure: Models and muddles.** Current Opinion in

Colloid & Interface Science, v. 11, n. 2–3, p. 148–153, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.

JALISWAL, Pranita et al. **Detection and quantification of soymilk in cow-buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR).** Food Chemistry, v. 168, p. 41–47, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.food-chem.2014.07.010>.

LI, Hongbo et al. **Effect of heat treatment on the property, structure, and aggregation of skim milk proteins.** Frontiers in Nutrition, v. 8, p. 714869, 2021. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.714869>.

LIN, Tiantian et al. **Bioactives in bovine milk: chemistry, technology, and applications.** Nutrition Reviews, v. 79, n. Suppl 2, p. 48–69, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab099>.

MARKOSKA, Tatijana et al. **FTIR analysis of physiochemical changes in raw skim milk upon concentration.** LWT Food Science and Technology, v. 102, p. 64–70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.011>.

MATSARSKAIA, Olga et al. **Evolution of the structure and dynamics of bovine serum albumin induced by thermal denaturation.** Physical Chemistry Chemical Physics, v. 22, n. 33, p. 18507–18517, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0CP01857K>.