

Artigo originariamente publicado na
Revista Médica da Aeronáutica, número 4, dezembro de 1949

ARTIGOS ORIGINAIS

A ESTRUTURA DO LEITE EM PÓ PESQUISADA NO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO (*)

ANTONIO CARLOS VILLANOVA

E

O. BALLARIN

I — DEFINIÇÃO DO LEITE EM PÓ

O Leite em pó é simplesmente a matéria seca do leite fresco, resultante da retirada da água (desidratação) nele contida.

É um sistema de partículas sólidas dispersas no ar, partículas que têm estrutura complexa. De fato, devem elas permitir que pela adição subsequente de água, em proporção adequada, se restabeleça o sistema primitivo, constituído de glóbulos de gordura em emulsão, proteínas em solução coloidal, lactose, sais e outras substâncias solúveis em solução molecular.

II — PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO LEITE EM PÓ

A estrutura do leite em pó está em função do processo de desidratação adotado. Sem entrar em descrições minuciosas, que fugiriam ao âmbito e à finalidade deste trabalho, convém lembrar que o leite pode ser pulverizado de várias maneiras: seja retirando o calor (baseado no calor latente de fusão), seja adicionando o calor (baseado no calor da evaporação). O esquema seguinte, inspirado em Hunziker (2), resume os processos em questão.

(*) — Trabalho laureado pela Academia Brasileira de Medicina Militar, em 8-XII-49. — Prêmio Oswaldo Pasqualin.

No nosso estudo, concentramos a atenção unicamente no produto obtido pelo processo Spray ou de "atomização". Neste, o leite, que já foi submetido ao "preaquecimento", à "precondensação parcial" no vácuo e à "homogeneização" (pela passagem, sob pressão, entre frestas finíssimas), é injetado através de tubos capilares, produzindo verdadeira "garoa". As gotículas assim formadas têm, em média, aproximadamente, 50 micras de diâmetro, e um litro de leite produz nada menos de 7 milhões de gotículas, com uma área total estimada em quase 30.000 metros quadrados! (2).

Ao embate com o ar, previamente filtrado e aquecido, produz-se rápida evaporação (1). O pó formado cai no fundo do recipiente, de onde é imediata e constantemente retirado, a fim de evitar que se manifestem reações secundárias, como seria a oxidação da gordura, etc.

III — ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO LEITE EM PÓ SPRAY

As partículas formadas como acima descrito, têm um tamanho que oscila, segundo alguns autores (2), de 10 a 100 micras e, segundo outros, de 75 a 150 micras (9). Influem sobretudo neste particular, além de outros fatores, a concentração de sólidos do leite no precondensado e o diâmetro dos tubos por onde é feita a "garoa".

A experiência tem demonstrado que as partículas finas demais não se dissolvem muito bem, possivelmente porque, entre elas, ao contato da água, fenômenos de superfície levam à formação de um menisco, que transforma imediatamente um conjunto de pequenas partículas num agrupado em cujo interior a água não penetra.

Por outro lado, as partículas muito grandes, também oferecem, em contato com a água, uma superfície pequena em relação ao seu tamanho, o que torna igualmente difícil a solubilidade.

Além disso, a manipulação de um pó excessivamente fino, torna-se bastante difícil na indústria, pelo aumento da carga estática.

Se o tamanho das partículas tem influência na solubilidade, a distribuição da gordura é em grande parte responsável pela conservação, como também o é, neste sentido, o teor

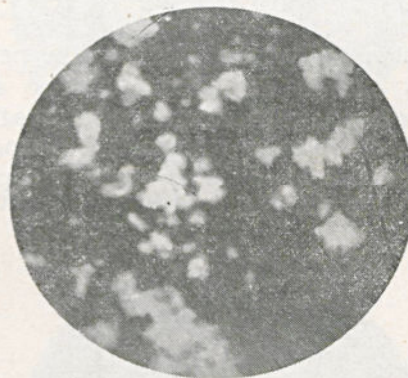
de oxigênio que se acha adsorvido ou retido nos pequenos vacúolos, justificando assim o seu exame ao microscópio (*).

IV — EMPRÊGO DO MICROSCÓPIO ÓTICO PARA O ESTUDO DA ESTRUTURA DO LEITE EM PÓ

Como já havia assinalado Porcher (6), o simples exame ao microscópio ótico permite ver, incontinentemente, se se trata de um leite obtido pelo sistema chamado de “cilindros”, ou pelo sistema “Spray”.

O primeiro (do qual não trataremos aqui) tem a aparência um tanto grosseira, sendo constituído de lamínulas compactas, de formato irregular, possivelmente sem bôlhas de ar. A gordura estaria, em parte, dissolvida na massa de proteínas, mas, em muito maior proporção, à superfície, tornando, assim, o leite dessa natureza muito sensível à ação do oxigênio do ar.

Ao contrário, as partículas do leite em pó “Spray”, são relativamente esféricas e bastante regulares de forma e superfície. A microfotografia n.º 1, nô-las mostra à luz ordinária transmitida ($\times 470$).

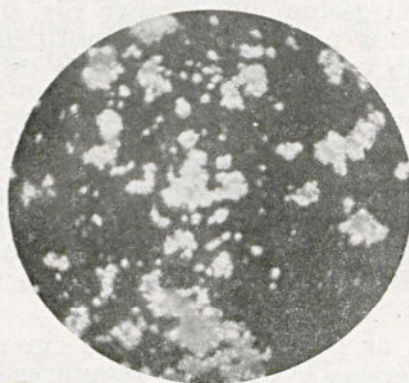


**MICROFOTOGRAFIA 1 — Partícula de leite em pó “Spray” —
(Luz ordinária transmitida)**

Ainda recentemente, Russel N. Bell (7) lembrou que o emprêgo da luz polarizada, permitindo melhor apreciar certos detalhes, deveria ser recomendado nos exames de rotina.

(*) — As particularidades do leite em pó, tais como sabor, aroma, peso específico, teor de umidade, etc., não foram consideradas no presente trabalho, porquanto a sua pesquisa exige outros processos físicos e químicos.

As mesmas partículas, que haviam sido vistas à luz comum na microfotografia n.º 1, têm o seguinte aspecto (microfotografia n.º 2) com a luz polarizada transmitida (usando como polarizador e analisador, lâminas de polaróide, ou seja, iôdo-sulfato de quinina).



MICROFOTOGRAFIA 2 — Partícula de leite em pó "Spray" — (Luz polarizada transmitida)

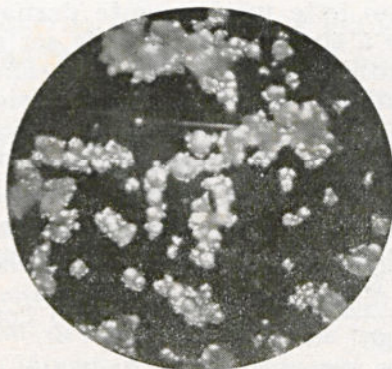
Outros exemplos da vantagem trazida pelo emprêgo da luz polarizada no exame dos leites em pó ao microscópio ótico, são dados pelas seguintes microfotografias, de um leite em pó obtido de leite parcialmente desnatado e acidificado (microfotos ns. 3 e 4), e de um leite em pó inteiramente desnatado (microfotos ns. 5 e 6).



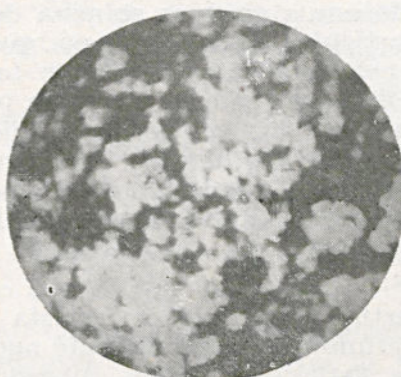
MICROFOTOGRAFIA 3 — Leite em pó — (Luz comum transmitida)

A ESTRUTURA DO LEITE EM PÓ

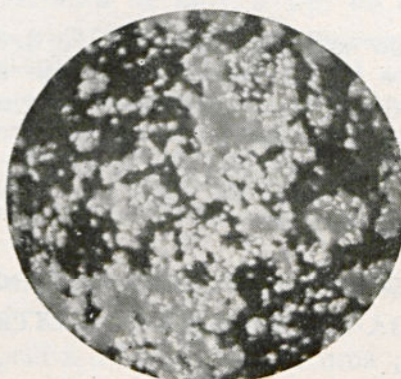
7



MICROFOTOGRAFIA 4 — Leite em pó — (Luz polarizada transmitida)



MICROFOTOGRAFIA 5 — Leite em pó inteiramente desnatado — (Luz comum transmitida)



MICROFOTOGRAFIA 6 — Leite em pó inteiramente desnatado — (Luz polarizada transmitida)

No que toca ao leite inteiramente desnatado, é interessante observar que a sua aparência pode ser confundida com a do leite completo (já veremos que o mesmo não acontece com o exame ao microscópio eletrônico — vide foto n.º 8).

Vários autores, porém, procuraram aplicar nesse exame, técnicas de coloração à semelhança do que é feito em outros ramos de biologia. Assim, por exemplo, Palmer & Dahle (5) aconselham a deixar cair o pó sobre acetona a 60% (o que faz com que coagulem as proteínas); adicionar — a seguir —

N

uma solução de $\frac{N}{50}$ HCl, e tratar o pó com uma solução

saturada de Sudan III em acetona. Depois de algum tempo é a preparação lavada com acetona a 20%.

Baseados em técnicas parecidas, Lampitt & Bushill (4), já haviam deduzido que a gordura se acha de tal forma enclausurada nas partículas de leite em pó, que não pode ser toda ela atacada pelos solventes habituais (o que explica o emprêgo de NH_4OH no método de extração pelo éter para a dosagem da gordura no leite em pó não diluído, assim como a boa conservação desse tipo de pó). Uma parte da gordura, no entanto, se acha assim mesmo exposta e pode ser imediatamente atingida pelos solventes. É ela apenas de 4 a 14% no leite "Spray", ao passo que alcança de 91 a 95% no leite em pó de cilindros.

Em recente artigo publicado em revista sueca de lactínicos, King (3) resumiu os resultados até agora conseguidos com essas técnicas. Estão eles, porém, subordinados ao poder de resolução do microscópio ótico, que, como demonstrou Abbe, fornece um aumento máximo, útil, de 1.800 a 2.000 diâmetros.

Como é sabido essa limitação não é devida a imperfeições dos aparelhos óticos, mas unicamente ao comprimento de onde da luz utilizada. Daí o nosso desejo, nas pesquisas levadas a efeito, de aumentar os conhecimentos nesse terreno, valendo-nos do grande poder de resolução do microscópio eletrônico. Sobre esse aspecto, nada encontramos a respeito na literatura internacional.

V — EMPRÊGO DO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO PARA O ESTUDO DA ESTRUTURA DO LEITE EM PÓ

Não trataremos aqui dos fundamentos da microscopia eletrônica, já abordados na literatura nacional (8). Lembra-

remos, apenas, que ao lado das suas grandes possibilidades, tem o microscópio eletrônico limitações provenientes seja do vacuo utilizado, seja da alta voltagem, seja do bombardeio pelos eletrons, que exigem, conforme as substâncias, técnicas especiais e que não permitem ainda, aliás, que seja aplicado com facilidade a tôdas as pesquisas.

Experimentamos, em vista disso, vários métodos. As dificuldades surgiram, de fato, quando tivemos necessidade de colocar o leite em pó em suspensão num líquido que não atacasse a lactose, os sais, etc., solúveis na água. Não convinha, tampouco, lançar mão de solvente orgânico que não atacasse as referidas substâncias, porque, então, seria dissolvida a gordura, e assim por diante. Daí não termos podido usar a chamada "técnica de envolvimento", tão empregada em microscopia eletrônica, porquanto fornece ela uma imagem empastada.

Por outro lado, colocando diretamente o pó sôbre a retícula metálica, não se obtém suficiente ação de sustentação, nem aderência perfeita, sendo o mesmo facilmente retirado pela ação da bomba de vácuo. Adotamos, por isso, a técnica seguinte:

— formação da película de colódio

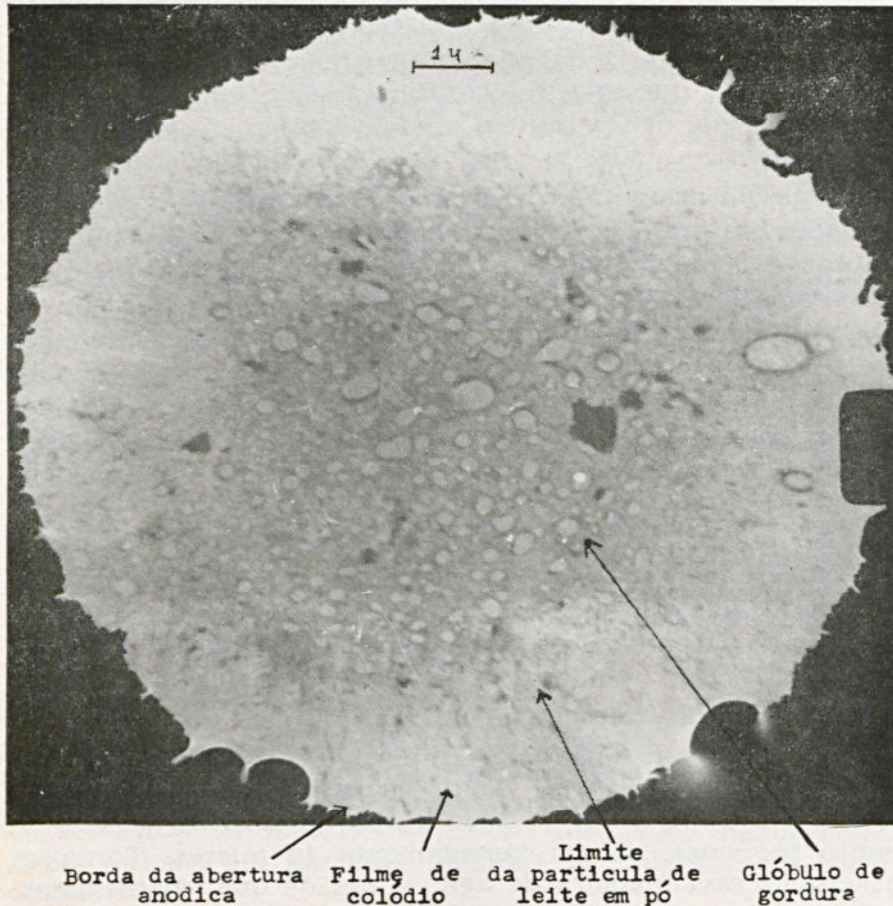
— deixar cair cuidadosamente sôbre essa película, o leite em pó passado através de uma peneira de 300 mesh. (Dessa forma, evidentemente, são apenas aproveitadas as partículas muito pequenas, de aproximadamente 10 micras. Torna-se necessária essa maneira de agir, a fim de que sejam vistas na sua totalidade, através do pequeno espaço livre das malhas da grade que sustenta a preparação)

— colocar, então, com todo cuidado, a fina grade metálica

— o conjunto é recolhido sôbre uma lâmina de vidro (que serve de suporte temporário) e colocado a secar na estufa

— assim que a substância estiver seca, fixa-se a grade no porta-objeto do microscópio eletrônico.

A microfotografia n.º 7 apresenta uma partícula de leite em pó inicialmente ampliada a 3.500 diâmetros e elevada, fotograficamente, a 14.000 diâmetros.



MICROFOTOGRAFIA 7 — Partícula de leite em pó ampliada a 3.500 diâmetros e elevada, fotograficamente, a 14.000 diâmetros

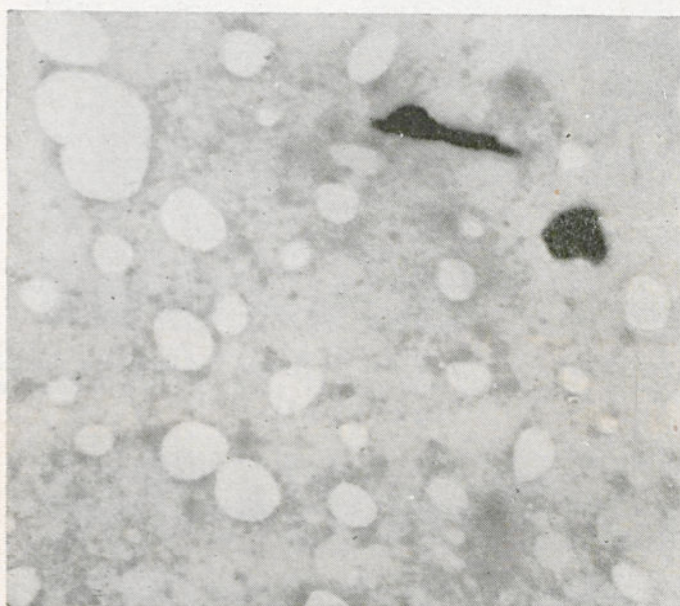
A massa uniforme, amorfa, é com toda probabilidade constituída de proteínas e lactose, na qual se acham distribuídos — em suspensão — pequeníssimos glóbulos de gordura e alguns cristais. A partícula aparece-nos, pois, como um conjunto “completo”, onde estão reunidas qualitativamente as substâncias fundamentais do leite. O fato da gordura se achar finamente dividida em pequenos glóbulos, justifica as excelentes propriedades do leite em pó na alimentação infantil.

A ESTRUTURA DO LEITE EM PÓ

11

A microfotografia seguinte (n.º 8) permite melhor observar um detalhe da microfotografia n.º 7, ampliada originariamente a 12.500 diâmetros e elevada, fotograficamente, a 50.000.

Outra microfotografia (n.º 9), reproduz pequena partícula, na qual também se distinguem os glóbulos de gordura distribuídos na massa amorfa.



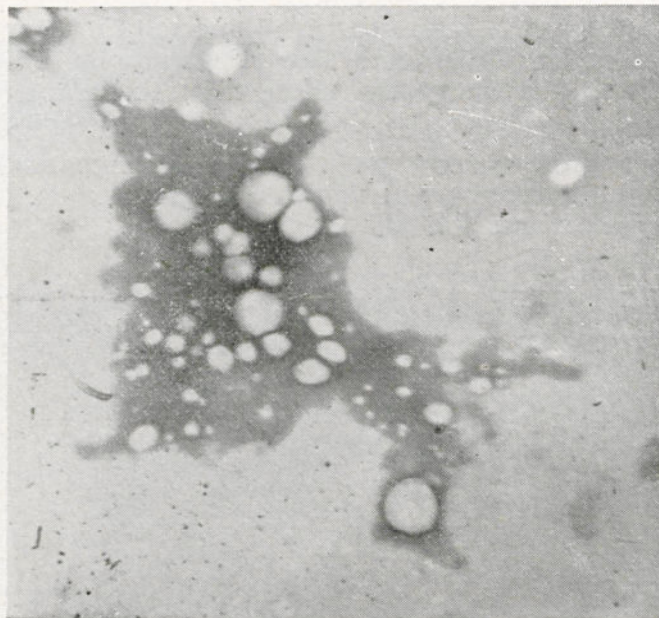
MICROFOTOGRAFIA 8

Aliás, no que toca à gordura, é interessante comparar as microfotografias ns. 7, 8 e 9, com a microfotografia n.º 10, que é de um leite em pó inteiramente desnatado. Vê-se a estrutura amorfa da massa intermediária, que já havíamos visto nas microfotografias anteriores, devendo-se frisar a total ausência dos glóbulos de gordura (os outros pontos seriam, em nossa opinião, produzidos pelos cristais existentes na massa da partícula aqui em maior concentração do que no leite completo).

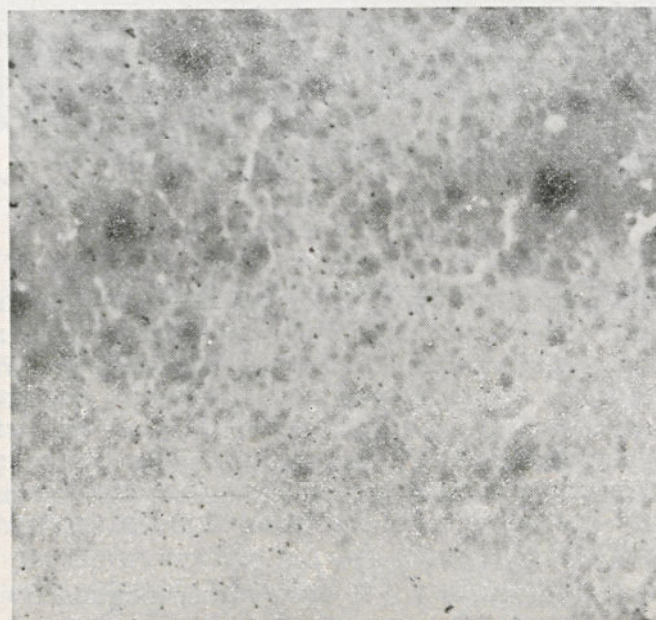
Nas microfotografias 7 e 8, observamos pequenos cristais no interior das partículas. A respeito às que seguem, ns. 11

12

REVISTA MÉDICA DA AERONÁUTICA



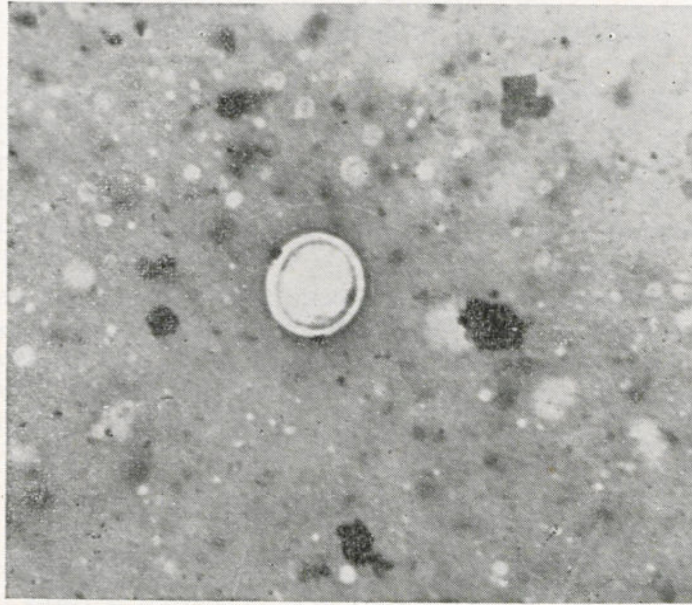
MICROFOTOGRAFIA 9 — Pequena partícula de leite em pó, na qual também se notam os glóbulos de gordura distribuídos na massa amorfa



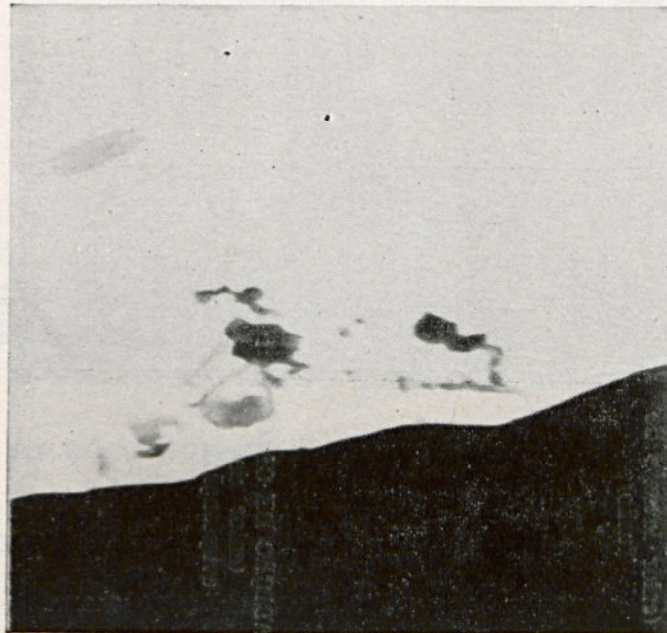
MICROFOTOGRAFIA 10 — Partícula de leite em pó inteiramente desnatado

A ESTRUTURA DO LEITE EM PÓ

13



MICROFOTOGRAFIA 11 — Partícula de leite em pó, na qual se nota maior número de elementos do que nas anteriores, assim como um defeito da película do colódio



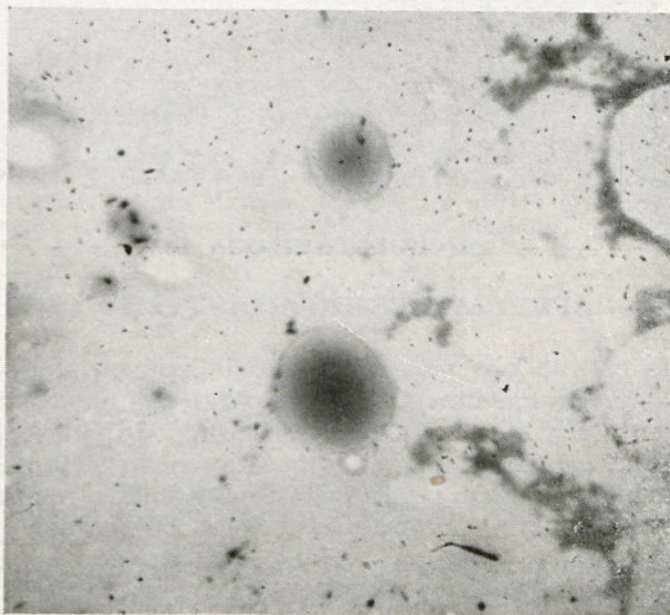
MICROFOTOGRAFIA 12

| | | |
|---|---|---|
| <p>RETIRADA DE CALOR (frio) (calor latente de fusão)</p> | <p>congeando o leite sob contínua agitação, maior parte da água se separa sob forma de cristais, que são eliminados por centrifugação</p> | <p>a "pasta" de leite resultante, é levemente aquecida para evaporação da água restante</p> |
| <p>frio e depois calor</p> | <p>sublimação</p> <p>a) a água do leite congela à baixa temperatura e pressão normal</p> <p>b) sublimação da água congelada, por leve adição de calor, enquanto é feito e mantido o vácuo — ficando as substâncias sólidas sem água</p> | |
| <p>secagem em camadas finas</p> | <p>s/cilindros aquecidos internamente</p> <p>na atmosfera no vácuo</p> | |
| <p>secagem em flocos</p> | <p>de leite precon-</p> <p>sado</p> <p>s/esteiras metálicas</p> <p>no vácuo</p> <p>na atmosfera</p> | |
| <p>Spray ou de Atomização</p> | <p>ar comprimido</p> <p>garoa vertical ou horizontal</p> <p>garoa centrifugada</p> | |

e 12, são mais instrutivas, porque nelas podemos apreciar maior número de elementos (cristais cúbicos de NaCl?). Nota: na foto n.º 11, nota-se, também, um defeito da película do colódio.

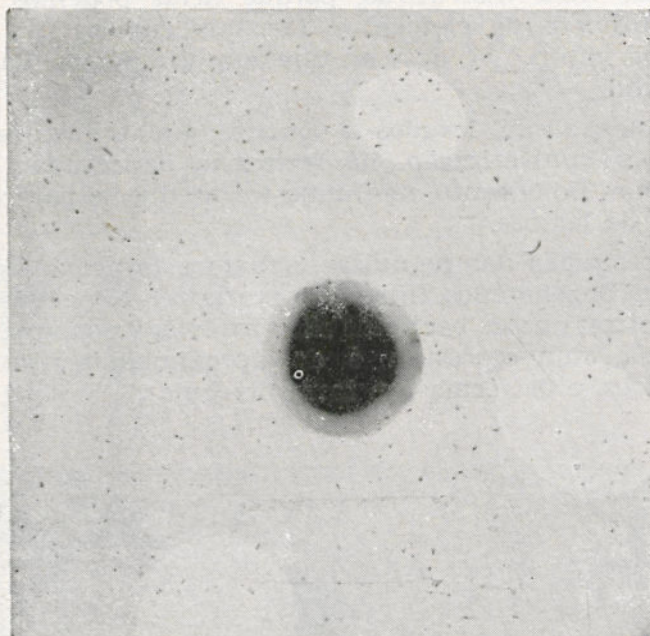
Somos, assim, levados a concluir que, efetivamente, por ocasião da pulverização, há formação de cristais. Não encontramos, no entanto, nenhuma forma que se parecesse com cristais de lactose.

Por ocasião das pesquisas, achamos também alguns micrococci degenerados (microfotografia n.º 13). O seu exame nos mostrou que as bactérias são envolvidas por uma película protetora, cuja espessura é de aproximadamente 0,000028 milímetros, e de forma um tanto irregular.



MICROFOTOGRAFIA 13 — Micrococci degenerados

Achamos interessante comparar esta microfotografia (n.º 13) com aquela obtida de culturas puras (n.º 14), a qual nos permite melhor estudar e verificar que, realmente, os micrococci têm uma película de proteção que, parece, contém pequenos corpúsculos ou outras substâncias.



MICROFOTOGRAFIA 14

VI — APRECIACÕES DO RESULTADO OBTIDO

Este estudo nos permitiu deduzir que partindo do leite fresco — o qual é um sistema coloidal complexo, cujo meio dispergente é a água — chega-se à uma suspensão de partículas no ar, onde cada partícula é um novo sistema coloidal mais variado, que tem como meio dispergente a massa amorfa composta de lactose e proteínas. Nela observamos:

- “sistema líquido em sólido”: gotículas de gordura
- “sistema sólido em sólido”: cristais de lactose
- “sistema gás em sólido”: bôlhas de ar. (*)

Colocando as partículas sobre a superfície da água e agitando fortemente, a lactose entra em solução e liberta os glóbulos de gordura e as proteínas, obtendo-se, destarte, um sistema idêntico ao inicial, ou seja, ao do leite fresco.

(*) — A sua existência é deduzida pela retenção do oxigênio, mas, no microscópio eletrônico, são eliminadas, devido à ação do alto vácuo.

VII — CONCLUSÃO

O microscópio eletrônico revelou-se, apesar das dificuldades encontradas, um excelente instrumento para permitir conhecer mais em detalhe a estrutura da partícula do leite em pó "Spray".

Das observações feitas, parece razoável admitir que em cada partícula de leite em pó se acham representadas, qualitativamente, as substâncias fundamentais do leite. A gordura aparece distribuída sob forma de pequeníssimas gotículas na massa amorfa composta, possivelmente, de uma mistura de lactose e proteínas. Alguns sais se cristalizam. Não foi, porém, notada qualquer forma de cristais típicos de lactose.

VIII — RESUMO

Os autores, após definir o que se deve entender por Leite em Pó, expõem, rapidamente, quais os processos de desidratação até hoje experimentados, focalizando a sua atenção sobre a partícula obtida pelo processo "Spray" ou de "atomização". Lembram e apresentam os resultados conseguidos no estudo dessas partículas com o microscópio ótico, as limitações deste e as técnicas até hoje usadas, justificando a tentativa de estudar a estrutura da partícula do leite em pó por meio do microscópio eletrônico.

Após citarem os cuidados que o emprego deste aparelho exige para esse fim, expõem a técnica por eles adotada e os resultados conseguidos.

Apresentam, a respeito, várias microfotografias e demonstram ser a partícula de Leite em Pó constituída de massa amorfa (resultante da mistura de proteínas e lactose), na qual a gordura se acha em suspensão sob forma de pequeníssimas gotículas, e alguns sais cristalizados. Não foram percebidos cristais de lactose.

BIBLIOGRAFIA

- 1) — Ballarin, O. — Notas sobre a Bioquímica do Leite — ed. do autor, p. 122 — 1947.
- 2) — Hunziker, O. F. — Condensed Milk and Milk Powder — 1946.
- 3) — King, N. — Torrmjölkens Fysikaliska Struktur — Svenska Mejeritidningen, 10:95 — 1946.
- 4) — Lampitt, L. H. & Bushill, J. H. — The Physico-Chemical Constitution of Spray-Dried Milk Powder. Fat in Spray Dried Milk Powder — Journal Society Chem. Ind. — 50:45 T — 1931 — apud King loc. cit.
- 5) — Palmer, L. S. & Dahle, C. D. — Structure of Powdered Milk and its possible Relation to the Keeping Quality of Whole Milk Powders — Journal of Dairy Science — V — 5 — 1922.
- 6) — Porcher, Ch. — Le Lait Sec.
- 7) — Russel, N. Bell — Polarizing Microscope — A quality control instrument — Food Industries, 20:1.775 — 1948.
- 8) — Villanova, A. C. — Modificações dos Especimes na Microscopia Eletrônica, determinadas pela Emissão Catódica — Revista de Química e Farmácia — Vol. XIV — N.º 3 — Março de 1949; A Microscopia Eletrônica e a Pesquisa Científica — Revista de Química e Farmácia — Vol. XIV — N.º 4 — Abril de 1949.
- 9) — Washburn, R. M. — The Physical Analysis of Dry Milk — Journal of Dairy Science — V — 5:388 — 1922.