

Proteólise da κ -caseína em leite e bebida láctea UAT durante o período de validade comercial*

κ -casein proteolysis during the shelf-life of UHT milk and milk beverage

Karina Paes Bürger,** Gabriel Augusto Marques Rossi,** Ana Maria Centola Vidal,*** Ana Paula Rodomilli Grisolio,** Ana Carolina Siqueira Gonçalves**

Resumo

A proteólise do leite e da bebida láctea UAT durante a estocagem é um dos fatores mais importantes na determinação da validade comercial desses. O teor de glicomacropéptidos (GMP) é um marcador das ações proteolíticas no leite, pois é capaz de indicar indiretamente a integridade da κ -caseína. Assim, no presente trabalho, objetivou-se avaliar a proteólise da κ -caseína do leite e da bebida láctea UAT ao longo do período de validade. Foram avaliadas 60 amostras de cinco diferentes marcas comerciais de cada produto através do método espectrofotométrico para quantificação de ácido siálico. Para o leite UAT foi observado o intervalo entre 3,83 e 15,27 μg de ácido siálico/mL no início do período de validade (D0), 5,95 a 17,16 μg de ácido siálico/mL 60 dias após o início do período (D60) e 6,54 a 21,11 μg de ácido siálico/mL no final do período, ou seja, 120 dias após (D120) a produção. Já para as bebidas lácteas foram observados intervalos entre 11,12 e 24,25; 15,74 e 24,73 e 17,19 e 26,49 μg de ácido siálico/mL para o dia inicial, 60 e 120 dias do período de validade, respectivamente. Os valores obtidos para o índice proteolítico do leite e bebida láctea UAT aumentaram gradativamente ao longo do período de validade dos produtos, sendo tal diferença detectável a partir de sessenta dias. Não foi observada influência da abertura da embalagem na proteólise da κ -caseína.

Palavras-chave: ácido siálico, espectrofotometria, glicomacropéptidos

Abstract

The UHT milk and milk beverage proteolysis during storage is the major factor that limits the shelf-life of these products. The GMP content has assumed importance because it can indirectly indicate the integrity of κ -casein in milk. So, this study focused on evaluates the κ -casein proteolysis in UHT milk and milk beverage during the shelf-life. 60 samples obtained of five different brands of each product were evaluated by spectrophotometric assay for quantifying acid sialic. For UHT milk was observed the values ranging from 3.83 to 15.27 μg acid sialic/ml at the begin of the shelf-life, from 5.95 to 17.16 mg sialic acid/ml at the middle of the period (60 days after the production) and 6.54 to 21.11 mg sialic acid/ml at the end of shelf-life (120 days). For milk beverages were observed ranges between 11.12 to 24.25, 15.74 to 24.73 μg of sialic acid/ml and from 17.19 to 26.49 mg sialic acid/ml respectively for the beginning, 60 and 120 days of the shelf-life. The proteolysis rate in UHT milk and milk beverage increased during the shelf-life and is detectable after 60 days of the shelf-life. The practice of open the package did not influence the κ -casein proteolysis.

Keywords: sialic acid, glycomacropéptide, spectrophotometric assay.

Introdução

Dentre os diferentes tipos de leite comercializados no Brasil, o leite tratado por ultra-alta temperatura (UAT) vem se destacando, principalmente por dispensar refrigeração durante seu armazenamento, transporte e comercialização e permitir longa validade comercial. O leite UAT é o produto homogeneizado que foi submetido a uma temperatura entre 130 e 150°C por 2 a 4 segundos mediante um processo térmico de fluxo contínuo e imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C, sendo envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 1997).

Este produto comumente é exposto nas prateleiras dos supermercados juntamente com outro produto, a bebida láctea,

que também é submetida ao tratamento por UAT, assim como também é acondicionada em embalagens hermeticamente fechadas. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (Brasil, 2000), entende-se por Bebida Láctea o produto obtido a partir do leite ou leite reconstituído e/ou derivados do leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto, sendo que um muito utilizado é o soro de leite (Caldeira et al., 2010).

A proteólise da caseína presente no leite UAT durante a estocagem do produto em temperatura ambiente é um dos fatores mais importantes na limitação do período de validade comercial devido às mudanças no sabor e textura que ocorrem

*Recebido em 03 de fevereiro de 2015 e aceito em 14 de dezembro de 2015.

**Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

***Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus Pirassununga, São Paulo, Brasil.

Autor para correspondência: karinaburger@fcav.unesp.br

no produto (Datta e Deeth, 2003). No leite UAT, menos de 50% das enzimas proteolíticas são inativadas e estas são capazes de hidrolisar a caseína disponível no leite em peptídeos, resultando no aparecimento de sabor amargo devido à presença de peptídeos que possuem essa característica sensorial (Mitchel e Ewings, 1985).

Essas enzimas proteolíticas atuam nas frações da micela de caseína (κ , α e β), sem, contudo, apresentar atividade degradante nas proteínas do soro (Muir, 1996). A determinação do teor de glicomacropéptídeos (GMP) ou ácido siálico por espectrofotometria está relacionada com a ocorrência desse processo e também para detecção de fraudes por adição de soro de leite, visto que GMP é o produto obtido da ação da renina sobre a κ -caseína durante a produção de queijos e está presente em elevadas concentrações no soro de leite (Prata e Prata, 2012).

Devido ao grande consumo de leite e bebida láctea UAT no Brasil, objetivou-se avaliar a proteólise da κ -caseína do leite e da bebida láctea UAT em amostras disponíveis no comércio durante a validade comercial.

Materiais e métodos

As amostras foram adquiridas aleatoriamente em supermercados da região do Município de Jaboicabal, totalizando 60 unidades, sendo 30 de leite UAT integral e 30 de bebida láctea UAT. Foram analisadas cinco diferentes marcas comerciais nacionais de cada produto, sendo que as seis amostras de cada marca foram divididas em três lotes de acordo com o período de validade (D0 – momento da compra; D60 – 60 dias após a produção, correspondendo à metade do período de validade; D120 – 120 dias após a produção, correspondendo ao final do período de validade) sendo obtidas, portanto, duas amostras do mesmo lote.

Para quantificação do ácido siálico, utilizou-se a metodologia espectrofotométrica desenvolvida por Fukuda (1994), a qual permite uma estimativa indireta das condições proteolíticas das amostras.

Para melhor compreensão do processo, as marcas foram comparadas entre si usando-se uma técnica de estatística multivariada denominada análise de agrupamentos através da distância euclidiana. Para tanto, foi utilizado o *software* Statistica 7®.

Os tratamentos foram comparados por meio de análise de variância. Inicialmente foi feito diagnóstico para análise da normalidade do resíduo.

Havendo normalidade, foi efetuada a análise de variância. Quando se observou efeito de um dos dois fatores (período e tempo), porém não se observou efeito da interação entre eles, foi analisado o efeito do fator, comparando-se as médias por meio do teste de Tukey. Quando se observou efeito da interação, foi analisado o desdobramento da interação, e foram feitas comparações múltiplas usando-se o teste de Tukey.

Nos casos em que não foi possível obter normalidade do resíduo mesmo após remoção de valores discrepantes, a análise foi efetuada usando-se estatística não paramétrica através do teste de Kurskal-Wallis. Foi adotado nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$). As análises foram efetuadas utilizando-se o *software* R®.

Resultados e discussão

As marcas comerciais de leite UAT foram separadas em três diferentes grupos para melhor apresentação dos resultados, após realização de análise estatística multivariada pelo método de agrupamento, conforme observado na Figura 1. Pode-se observar comportamentos similares entre as marcas D e C, e entre as marcas E e A. Somente a marca B não apresentou semelhança com as demais, sendo essa mais próxima das marcas D e C.

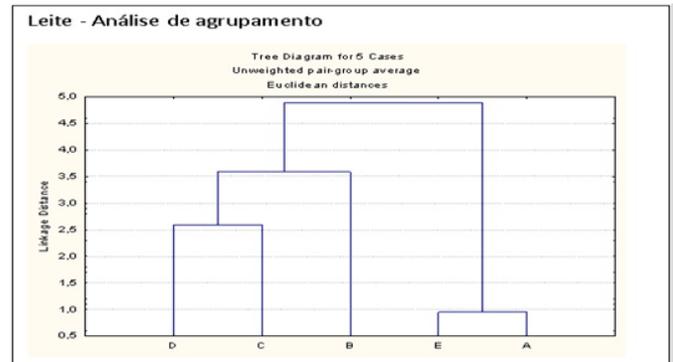


Figura 1: Análise de agrupamento utilizando-se distância euclidiana através da análise estatística multivariada de cinco diferentes marcas de leite UAT de acordo com a proteólise da κ -caseína.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos índices proteolíticos ao longo do prazo de validade e a análise estatística correspondente. Para o leite UAT foi observada a faixa entre 3,83 a 15,27 μg de ácido siálico/mL no início do período de validade (D0), 5,95 a 17,16 μg de ácido siálico/mL no meio do período (D60) e 6,54 a 21,12 μg de ácido siálico/mL no final do período (D120).

Através da análise estatística dos dados contidos na Tabela 1, pode-se observar efeito significativo na quantidade de GMP detectado devido à influência do período de validade em que estava a amostra no momento da análise.

Para as marcas A e C, foi observada diferença significativa estatisticamente a partir da metade do D60, não havendo diferença significativa a partir dessa data. Já a marca B apresentou outro comportamento da proteólise, a qual mostrou uma redução inicial significativa, porém com posterior aumento, mas não significativo. Ainda, as marcas D e E diferiram estatisticamente em todos os períodos de validade. Isso demonstra que a quantidade de ácido siálico detectado durante o período de validade da amostra aumenta gradativamente devido à proteólise que sofre a κ -caseína do leite.

Ortín-Rodríguez e Sanchez-Algaba (1990) verificaram um aumento linear da quantidade de ácido siálico livre durante a vida comercial do leite UAT. Tais autores afirmam que os glicomacropéptídeos (GMP) são liberados através da quebra da caseína pela ação das proteases bacterianas, produzidas por bactérias psicrotróficas presentes no leite cru, que podem atuar diretamente sobre a κ -caseína (para- κ -caseína + GMP). As bactérias são eliminadas durante o tratamento por UAT; porém, suas enzimas termorresistentes continuam atuando lentamente sobre as proteínas durante o armazenamento do leite.

Tabela 1: Médias dos índices proteolíticos de cinco marcas comerciais de leite UAT, em três diferentes períodos ao longo do período de validade, obtidas no município de Jaboticabal, estado de São Paulo, durante 2005

Índice proteolítico (μg ácido siálico/mL)					
Marcas	Períodos	T0*	T24*	T48*	Média
A	Início	4,22	3,83	3,88	3,98 a
	Meio	6,61	6,93	7,16	6,90 b
	Final	7,02	8,18	6,54	7,25 b
	Média	5,95 A	6,31 A	5,86 A	
B	Início	14,44	15,27	13,27	14,33 a
	Meio	6,43	5,95	6,66	6,35 b
	Final	13,83	15,70	15,50	15,01 a
	Média	11,57 A	12,31 A	11,81 A	
C	Início	10,25	9,68	9,85	9,93 a
	Meio	11,06	11,40	11,47	11,31 b
	Final	12,33	13,62	21,12	15,69 b
	Média	11,21 A	11,57 A	14,15 A	
D	Início	11,01	12,05	11,85	11,64 a
	Meio	16,77	16,39	17,16	16,77 b
	Final	12,90	14,17	13,60	13,56 c
	Média	13,56 A	14,20 A	14,20 A	
E	Início	6,05	6,15	6,18	6,13 a
	Meio	6,55	7,27	6,97	6,93 b
	Final	7,55	7,66	7,80	7,67 c
	Média	6,72 A	7,03 B	6,98 B	

* As amostras foram analisadas no momento da abertura das caixas (T0) de leite UAT e após 24 (T24) e 48 horas (T48) de conservação em refrigerador.

Bizari (2002) avaliou o índice proteolítico de 20 amostras de leite UAT recém-processado ao longo do período de validade e constatou que a ação sobre a κ -caseína foi contínua e crescente durante a vida comercial do produto. O mesmo também foi observado por Vidal-Martins (2005).

Referente à influência do momento após abertura da embalagem até o momento da realização da análise, pode-se observar influência apenas na Marca E. Tal produto apresentou diferença estatisticamente significativa a partir do período de 24 horas de abertura (T24*). Porém, por ter sido notada diferença somente nessa marca, acredita-se que a abertura da embalagem não influencia na atividade proteolítica da κ -caseína. Deve-se destacar também que não houve interação entre os fatores período de validade e período após abertura para o produto leite UAT.

As marcas comerciais obtidas de bebida láctea UAT puderam ser separadas em três diferentes grupos para melhor apresentação dos resultados, após realização de análise estatística multivariada pelo método de agrupamento, conforme observado na Figura 2.

De acordo com a análise estatística multivariada por agrupamento, estabeleceu-se que a marca H não apresentou proteólise

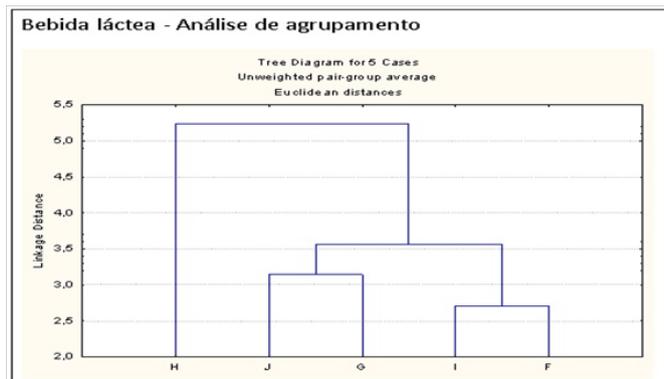


Figura 2: Análise de agrupamento utilizando-se distância euclidiana através da análise estatística multivariada de cinco diferentes marcas de bebida láctea UAT de acordo com a proteólise da κ -caseína.

semelhante às demais. Pode ser observado comportamento semelhante entre as marcas J e G, e as marcas I e F.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados dos índices proteolíticos ao longo do período de validade.

Tabela 2: Médias dos índices proteolíticos de cinco marcas comerciais de bebida láctea UAT, em três diferentes tempos de análise ao longo do período de validade obtidas no município de Jaboticabal, estado de São Paulo, durante 2005

Índice proteolítico (μg de ácido siálico/mL)					
Marcas	Períodos	T0*	T24*	T48*	
F	Início	15,02	16,23	16,52	15,92
	Meio	22,19	24,73	18,48	21,80
	Final	19,97	20,42	17,19	19,19
		19,06	20,46	17,40	
G	Início	13,04	13,39	11,12	12,52 a
	Meio	20,83	17,81	19,43	19,36 b
	Final	20,90	20,32	20,63	20,62 b
		18,26 A	17,17 A	17,06 A	
H	Início	17,21	17,95	24,35	19,84 a
	Meio	15,74	19,53	16,74	17,34 ab
	Final	26,49	19,27	25,81	23,86 b
		19,81 A	18,92 A	22,30 A	
I	Início	16,45	15,79	17,82	16,69 a
	Meio	23,25	20,42	19,66	21,11 b
	Final	22,26	21,50	21,93	21,90 b
		20,65 A	19,24 A	19,80 A	
J	Início	12,35	13,05	12,61	12,67 a
	Meio	18,38	24,57	24,50	22,48 b
	Final	17,88	19,91	20,17	19,32 b
		16,20 A	19,18 A	19,09 A	

*As amostras foram analisadas no momento da abertura das caixas (T0) de bebida láctea e após 24 (T24) e 48 horas (T48) de conservação em refrigerador.

A marca F apresentou diferença estatisticamente significativa quanto ao efeito dos fatores período de validade e tempo de abertura da embalagem, inclusive com interação entre eles no momento T24⁺ e a metade do período de validade (D60), conforme pode ser observado na Tabela 3.

As marcas F e I apresentaram semelhança em relação ao efeito do período de validade na quantificação de ácido siálico, diferindo

Tabela 3: Médias dos índices proteolíticos da marca comercial F de bebida láctea UAT, em três diferentes tempos de análise, ao longo do período de validade no município de Jaboticabal, estado de São Paulo durante 2005

Período	Tempo			Média
	T0	T24*	T48*	
Início	15,015a A	16,225a B	16,520a A	15,92
Metade	22,190a,b B	24,730b A	18,480a A	21,8
Final	19,965a A,B	20,415a A, B	17,190a A	19,19
Média	19,057	20,457	17,398	18,97

Referências

- BIZARI, P.A. *Eficiência da contagem microscópica da matéria-prima utilizada no processamento de leite UAT**. (*ultra-alta temperatura). 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do leite UHT (UAT). Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do Leite e Produtos Lácteos. Brasília. p. 117-120, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 36, 31/10/2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Diário Oficial da União, seção I, p. 22-23, 2000.
- CALDEIRA, L.A.; FERRÃO, S.P.B.; FERNANDES, S.A.A.; MAGNAVITA, A.P.A.; SANTOS, T.D.R. Desenvolvimento de bebida láctea sabor morango utilizando diferentes níveis de iogurte e soro lácteo obtidos com leite de búfala. *Ciência Rural*, v. 40, n.10, p. 2193-2198, 2010.
- DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.
- FUKUDA, S.P. *Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite*. 1994, 142 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade de Campinas, Campinas, 1994. Disponível em: <http://cutter.unicamp.br/document/?code=000078866> Acesso em 19 fev. 2013.

estatisticamente a partir da metade do período de validade (D60), igualmente observado nas marcas J e G. Somente a marca H apresentou diferença estatisticamente significativa apenas no período final de validade do produto (D120).

Observam-se valores muito mais acentuados nas bebidas lácteas do que os do leite para o índice proteolítico, pois esta apresenta em sua composição de 30 a 70% de soro (Brasil, 2000), o qual possui grandes quantidades de glicomacropéptídeos, e conseqüentemente ácido siálico.

Deve-se considerar também a qualidade higiênico-sanitária do leite utilizado como matéria-prima na composição da bebida láctea ou do leite UAT, pois a presença de psicrotróficos no leite cru que produzem enzimas proteolíticas termorresistentes poderá acarretar em ação enzimática e elevação do índice proteolítico nos produtos (Vidal-Martins et al., 2005).

Conclusões

Os valores obtidos para o índice proteolítico do leite e bebida láctea UAT aumentaram gradativamente ao longo do período de validade dos produtos, sendo tal diferença detectável a partir de sessenta dias de produção (D60). Ainda não foi observada influência da abertura da embalagem na proteólise da k-caseína.

MITCHEL, G.E.; EWINGS, K.N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk. *New Zealand Journal Dairy Science and Technology*, v. 20, p. 65-76, 1985.

MUIR, D.D. The fresh-life of dairy products: 1. factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of Society of Dairy Technology*, v. 49, n. 1, p. 24-32, 1996.

ORTIN-RODRIGUEZ, L.; SANCHEZ-ALGABA, T. Gelación de la leche UHT: ácido sialico libre y amoniaco. *Alimentaria*, v. 27, n. 213, p.15-20, 1990.

PRATA, L.F.; PRATA, C.B. Determinação de GMP e CMP no leite por métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – parâmetros metodológicos. *Archives of Veterinary Science*, v.17, n. 2, p. 29-39, 2012.

R. CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria, 2013.

VIDAL-MARTINS, A. M. C. Leite UAT: *Estudo de características microbiológicas e físico-químicas e investigação epidemiológica do Bacillus cereus ao longo de sua produção e vida comercial*. 2005. 130 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2005.