

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE WPNI E HMF EM LEITE UHT ATRAVÉS DA ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS****Leandra N. O. Neves<sup>b</sup>, Paulo Henrique F. da Silva<sup>a</sup> e Marcone A. L. de Oliveira<sup>b,\*</sup>**<sup>a</sup>Departamento de Nutrição, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora – MG, Brasil<sup>b</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900 Juiz de Fora – MG, Brasil

Recebido em 21/01/2016; aceito em 29/02/2016; publicado na web em 06/05/2016

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF WPNI AND HMF IN UHT MILK THROUGH THE PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS. During heat treatment milk suffers changes among which whey proteins insolubility and Maillard reaction can be monitored using spectrophotometric methods by determining the whey protein nitrogen (WPNI) and 5-hydroxymethylfurfural (HMF). The aim of this work was the evaluation of heat treatment in commercial UHT milk samples through HMF and WPNI determination by spectrophotometric methods in visible region, using chemometric tools in data analysis. The regression models were fitted and statistical assumptions were tested. The WPNI confidence interval (CI) was (0.91; 3.73) mg mL<sup>-1</sup> showing the heat treatment severity and classifying the samples as “medium heat treatment” according to American Dairy Products Association. For free HMF index, the CI were: (2.39; 3.27) and (6.01; 6.89) μmol L<sup>-1</sup> for regular and low lactose content samples, respectively; while these two samples group presented CI of (11.67; 12.39) and (132.28; 143.22) μmol L<sup>-1</sup> for total HMF index, respectively; showing the influence of lactose content in total HMF index. Descriptive statistical analysis associated with principal component analysis demonstrated a lack of standardization in the current Brazilian UHT process. The spectrophotometric methods allowed obtaining further inferences about the product quality associated to its heat treatment.

Keywords: Maillard reaction; denaturation; chemometric; quality control.

**INTRODUÇÃO**

Durante o processamento térmico o leite sofre modificações devido à ação do calor, dentre as quais tem-se a insolubilização das soroproteínas e a reação entre proteínas e lactose, denominada reação de Maillard (RM).<sup>1</sup> Especificamente estas duas modificações químicas causadas pela ação do calor geram compostos capazes de serem determinados através de métodos espectrofotométricos,<sup>2,3</sup> permitindo monitorar e controlar a severidade do tratamento térmico aplicado ao produto.

Métodos espectrofotométricos têm sido usualmente utilizados para determinação de alguns constituintes químicos em matrizes alimentícias<sup>4-11</sup> devido à fácil aplicação, eficácia e eficiência aceitáveis, e baixo custo quando comparados a métodos analíticos mais sofisticados como, por exemplo, cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE),<sup>12,13</sup> cromatografia a gás (CG),<sup>14-16</sup> cromatografia por fluido supercrítico (CFS)<sup>17-19</sup> e eletroforese capilar (EC)<sup>20-23</sup> associados a detectores compatíveis com cada sistema de separação.

A metodologia proposta por Kuramoto *et al.*<sup>2</sup> para determinação do índice de soroproteína não desnaturada ou whey protein nitrogen index (WPNI) via turbidimetria utiliza o princípio de “salting out” com adição de cloreto de sódio em excesso. Sabe-se que ao aumentar a força iônica de um meio há a tendência na redução da capacidade solvente da água e, conseqüentemente, da espessura da dupla camada elétrica que envolve as proteínas. A redução de tais efeitos estabilizadores proporciona uma efetiva perda de solubilidade protéica gerando precipitação.<sup>24</sup> Ao serem submetidas ao processo de “salting out”, caracterizando a primeira etapa da marcha analítica, as proteínas já desestabilizadas pela ação do calor durante o tratamento térmico do produto precipitam facilmente frente ao excesso de sal adicionado, o qual torna o meio desfavorável

à manutenção de sua solubilidade. Por conseguinte, somente as proteínas não desnaturadas pelo tratamento térmico aplicado ao alimento permanecerão solúveis no meio de elevada força iônica, passando ao filtrado durante a execução da metodologia proposta, enquanto as proteínas desnaturadas são precipitadas via “salting out” e retidas em papel-filtro.

Neste contexto, a fração do soro de leite é frequentemente utilizada para monitoramento dos efeitos do calor sob os produtos lácteos, uma vez que tais proteínas são diretamente afetadas. De acordo com o *American Dairy Products Institute* (ADPI), o índice de WPNI pode ser utilizado para classificar o produto quanto à severidade do tratamento térmico ao qual foi submetido. Neste caso, produtos com índices acima de 6 mg WPN mL<sup>-1</sup> leite são classificados como “produto de baixo aquecimento”; índices entre 1,51 e 5,99 mg WPN mL<sup>-1</sup> leite classificam o produto como “médio aquecimento” e índices abaixo de 1,50 mg WPN mL<sup>-1</sup> leite remetem a “produto de alto aquecimento”.<sup>25-27</sup>

No alimento, a RM se desenvolve via condensação de grupos amino, provenientes de proteínas, e grupos carboxilas, provenientes de carboidratos redutores, originando como intermediário de reação o 5-hidroxi-metilfurfural (HMF), e seguindo por reações de polimerização gerando polímeros complexos de coloração amarronzada, os quais oferecem cor e sabor ao produto. Em produtos lácteos como doce de leite esta reação torna-se desejável a fim de conferir ao produto os atributos sensoriais característicos.<sup>28-30</sup> No entanto, sua ocorrência em leite fluído para consumo direto, como o leite UHT, pode gerar características indesejáveis ao produto como sabor de cozido e coloração inadequada, as quais tendem a causar aversão do público consumidor ao produto.<sup>31</sup>

O esquema reacional, bem como o método de identificação do HMF, foi estudado originalmente por Keeney e Bassette.<sup>3</sup> O método analítico, realizado via espectrometria, visa a determinação do índice de HMF através de uma reação deste composto com o ácido

\*e-mail: marcone.oliveira@ufjf.edu.br

tiobarbitúrico (TBA), a qual gera um complexo, desta vez de coloração amarelada, facilmente detectado em 443 nm.

Verifica-se que os métodos propostos para WPNI e HMF utilizam a espectrofotometria como técnica analítica capaz de identificar e quantificar diferentes analitos em bases lácteas, oferecendo informações a cerca das condições de processamento e qualidade do produto final, a fim de caracterizá-las quanto ao tipo de tratamento térmico adotado.<sup>13,25-27,31-35</sup>

O presente trabalho teve como principal contribuição a avaliação do efeito do processamento térmico de amostras comerciais de leite UHT através da determinação dos índices de WPNI e HMF por espectrofotometria no visível, interpretados por meio de ferramenta quimiométrica.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em espectrofotômetro UV/Visível (ThermoScientific® Evolution 60S, Vantaa, Finland) mono-feixe de largura de banda espectral de 1 nm, equipado com lâmpada Xe e detector de fotodiodos.

### Material e reagentes

Utilizou-se água deionizada (sistema Mili-Q, Milipore, Bedford, MA, USA) para o preparo de todas as soluções e diluições. Padrões de leite para construção do modelo de regressão para WPNI foram obtidos do *American Dairy Products Institute* (Elmhurst, IL, USA), e padrão de 5-hidroximetilfurfural (HMF) Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os reagentes cloreto de sódio (NaCl) p.a. e ácido clorídrico (HCl) p.a. foram obtidos da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e ácido tiobarbitúrico (TBA) Merck (Darmstadt, Hessen, Alemanha).

### Aquisição das amostras comerciais

Visando efetuar um estudo do perfil do produto atualmente comercializado no mercado brasileiro, as amostras comerciais foram coletadas de forma aleatória nas principais regiões produtoras de leite UHT do Brasil (Sudeste, Centro-Oeste e Sul).

Desta forma, dezoito marcas comerciais nacionais de leite UHT foram selecionadas. Todas as marcas selecionadas apresentavam o produto leite UHT desnatado com teor regular de lactose, classificado no trabalho como “regular” e, dentre as dezoito marcas, três delas apresentavam além do produto “regular”, leite UHT semidesnatado com teor reduzido de lactose, classificado no presente estudo como ‘delactosado’. O esquema abordado pela Figura 1 evidencia o número de amostras para cada tipo de leite avaliado.

Vale ressaltar que todas as amostras foram coletadas de forma aleatória, não havendo padronização do tempo de fabricação, a fim de simular a compra do produto pelo consumidor.

### Metodologias para determinação dos índices de WPNI e HMF em leite UHT

As amostras coletadas foram analisadas em triplicata quanto ao índice de WPNI de acordo com metodologia proposta por Kuramoto *et al.*<sup>2</sup> e, quanto aos índices de HMF livre e total, segundo método proposto por Keeney e Bassette,<sup>3</sup> ambos descritos na Figura 2 a seguir.

Para a construção da curva analítica para o índice de WPNI utilizou-se padrões de leite em pó desnatado ADPI<sup>25</sup> submetidos a elevado aquecimento (baixa concentração de WPNI: 0,63 mg WPN mL<sup>-1</sup>

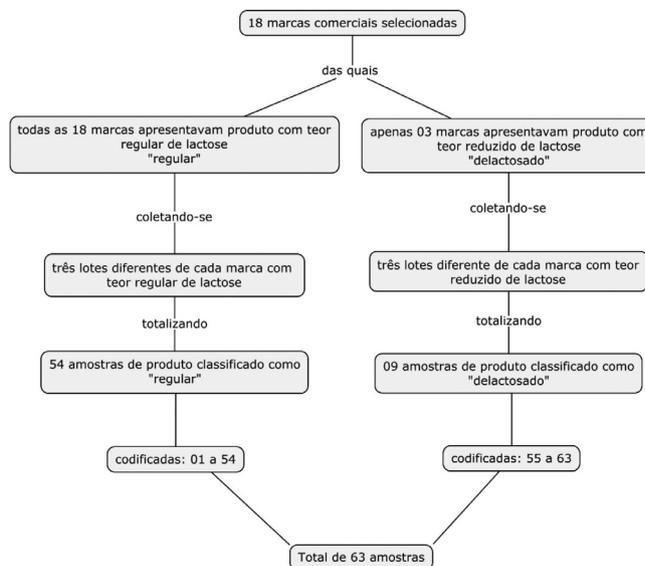


Figura 1. Esquema da amostragem realizada no mercado brasileiro, evidenciando o número de amostras coletado para cada tipo de leite (“regular” e “delactosado”)

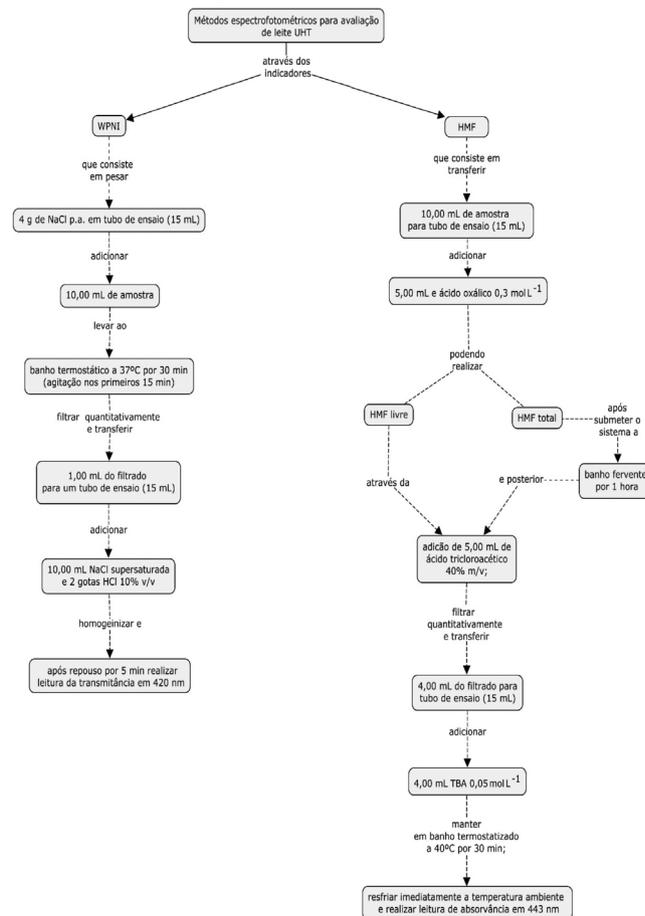


Figura 2. Fluxograma das metodologias propostas para determinação dos índices de WPNI e HMF em leite

leite) e a baixo aquecimento (alta concentração de WPNI: 7,86 mg WPN mL<sup>-1</sup> leite). O mesmo procedimento analítico proposto para as amostras foi aplicado aos padrões de leite ADPI, sendo os filtrados de cada um coletados e utilizados para a construção dos níveis da curva de acordo com os índices de WPNI descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Definição dos níveis analíticos, em triplicatas autênticas, para os modelos estatísticos dos índices de WPNI e HMF

| Índice de WPNI |                        |                       |                                      |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Nível          | Baixo aquecimento (mL) | Alto aquecimento (mL) | WPNI (mg WPN mL <sup>-1</sup> leite) |
| 1              | 10,00                  | 0,00                  | 7,86                                 |
| 2              | 8,00                   | 2,00                  | 6,41                                 |
| 3              | 6,00                   | 4,00                  | 4,97                                 |
| 4              | 4,00                   | 6,00                  | 3,52                                 |
| 5              | 2,00                   | 8,00                  | 2,08                                 |
| 6              | 0,00                   | 10,00                 | 0,63                                 |

| HMF   |                          |                   |                             |
|-------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Nível | Solução-estoque HMF (µL) | Volume final (mL) | HMF (µmol L <sup>-1</sup> ) |
| 1     | 39,2                     | 10,0              | 1,0                         |
| 2     | 47,0                     | 10,0              | 3,0                         |
| 3     | 94,0                     | 10,0              | 6,0                         |
| 4     | 141,0                    | 10,0              | 9,0                         |
| 5     | 188,0                    | 10,0              | 12,0                        |
| 6     | 587,0                    | 25,0              | 15,0                        |
| 7     | 784,0                    | 25,0              | 20,0                        |

A Tabela 1 demonstra ainda os níveis da curva para índice de HMF partindo-se de uma solução-padrão estoque de 638 µmol L<sup>-1</sup>. As curvas para WPNI e HMF foram reproduzidas em triplicatas autênticas de acordo com as concentrações apresentadas. A leitura, em espectrofotômetro, foi feita por sorteio inteiramente casual para ambos os índices avaliados.

### Análise estatística

A estatística descritiva dos dados obtidos para ambos os índices estudados foi realizada utilizando o software Assistat (*Statistical Assistance* - versão 7.7 beta). A homocedasticidade e falta de ajuste dos modelos foram avaliados através do software Excel (Microsoft Office, 2010). A fim de facilitar a interpretação, análise e discussão do considerável volume de informação gerada, realizou-se o agrupamento de dados mediante reconhecimento de padrão não supervisionado através da análise por componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), realizada através do software *Statistica 7.0*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ajuste dos modelos para quantificação do índice de WPNI e HMF

Usualmente, os trabalhos descritos na literatura abordando a determinação de WPNI e HMF não descrevem de forma clara o uso da análise estatística ou, ainda, como foi aplicada a estatística para o ajuste de regressão por mínimos quadrados ordinários de um modelo linear nos parâmetros.<sup>22</sup> Do ponto de vista formal, pressupostos como independência, homocedasticidade e normalidade devem ser verificados, a fim de garantir a confiabilidade das informações a serem inferidas. Dentro deste contexto, no intuito de verificar se o modelo proposto apresenta comportamento linear adequado, todos os experimentos na etapa descritiva foram realizados aleatoriamente a partir de uma solução padrão estoque de concentração definida

**Tabela 2.** Valores para ajuste do modelo para índice de WPNI

| WPNI (mg WPN mL <sup>-1</sup> leite) | 1ª Replicata | 2ª Replicata | 3ª Replicata |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 7,86                                 | 62,9         | 56,9         | 53,3         |
| 6,41                                 | 70,1         | 63,3         | 64,5         |
| 4,97                                 | 75,9         | 69,4         | 71,6         |
| 3,52                                 | 81,5         | 77,3         | 78,8         |
| 2,08                                 | 84,7         | 83,0         | 82,6         |
| 0,63                                 | 90,3         | 88,4         | 95,8         |

\*Teste de normalidade nos resíduos (Shapiro-Wilk): p = 0,81.

\*Teste de homocedasticidade (Cochran): C<sub>calc</sub> = 0,28.

**Tabela 3.** Valores para ajuste do modelo para índice de HMF livre e total

| HMF (µmol L <sup>-1</sup> ) | 1ª Replicata | 2ª Replicata | 3ª Replicata |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 1,0                         | 0,027        | 0,022        | 0,027        |
| 3,0                         | 0,031        | 0,031        | 0,032        |
| 6,0                         | 0,055        | 0,060        | 0,063        |
| 9,0                         | 0,091        | 0,091        | 0,088        |
| 12,0                        | 0,122        | 0,125        | 0,125        |
| 15,0                        | 0,145        | 0,149        | 0,154        |
| 20,0                        | 0,194        | 0,208        | 0,197        |

\*Teste de normalidade nos resíduos (Shapiro-Wilk): p = 0,064.

\*Teste de homocedasticidade (Cochran): C<sub>calc</sub> = 0,51.

(independência), e as respostas de sinais obtidas a partir das leituras submetidas ao teste de Cochran (teste de homocedasticidade), verificação da falta de ajuste do modelo através do teste ANOVA *a priori* e, por fim, avaliação da normalidade nos resíduos (teste de Shapiro-Wilk). Os valores para ajuste de modelo para WPNI e HMF se encontram nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Nenhum dos pressupostos testados foi violado no intervalo de 95% de confiança, pois os p-valores encontrados para os testes realizados foram maiores do que 0,05. Em outras palavras, os modelos apresentaram comportamento normal. Os resultados para o teste de Cochran apresentaram valores abaixo dos tabelados (C<sub>tab</sub> de 0,72 e de 0,66 para os modelos de WPNI e HMF, respectivamente) confirmando o comportamento homocedástico dos modelos. A independência foi atendida através da realização de experimentos de maneira aleatória (mediante sorteio) e com réplicas autênticas.<sup>36</sup>

Para a verificação da falta de ajuste do modelo utilizou-se Teste de Hipótese *a priori* (equação 1) recomendado pela IUPAC,<sup>37</sup> conforme descrito na equação (1).

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_{x,y}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2} \quad (1)$$

sendo: m<sub>i</sub> = número de medidas de cada ponto; p = número de pontos ou níveis; m = m<sub>i</sub> x p.

Se o valor calculado de F<sub>calc (p-2, m-p)</sub> for menor que o valor de F<sub>tab</sub> dentro do intervalo estimado, não haverá falta de ajuste no modelo e os coeficientes angular e linear das equações obtidas na etapa descritiva poderão ser usados para a predição quantitativa. Os valores dos parâmetros dos modelos para WPNI e HMF, bem como os valores de F para falta de ajuste, estão representados na Tabela 4. Os modelos de regressão foram considerados satisfatórios, uma vez que os valores

**Tabela 4.** Coeficientes do modelo proposto para WPNI e HMF e valores de F para verificação da falta de ajuste

| Parâmetro            | WPNI ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) | HMF ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Coefficiente angular | (-4,412 $\pm$ 0,267)            | (0,0095 $\pm$ 0,0002)          |
| Intercepto           | (93,913 $\pm$ 1,311)            | (0,0073 $\pm$ 0,0023)          |
| F <sub>calc</sub>    | 0,24                            | 2,82                           |
| F <sub>tab</sub>     | 3,26 <sup>a</sup>               | 2,96 <sup>b</sup>              |
| R <sup>2</sup>       | 0,94                            | 0,99                           |

<sup>a</sup>F<sub>tab</sub>(v<sub>1</sub>=4, v<sub>2</sub>=12), <sup>b</sup>F<sub>tab</sub>(v<sub>1</sub>=5, v<sub>2</sub>=14). Onde: v<sub>1</sub>: grau de liberdade do numerador (p-2); v<sub>2</sub>: grau de liberdade do denominador (m-p). Intervalo de 95% de confiança.

de F<sub>calc</sub> foram menores que F<sub>tab</sub> e, portanto, pode-se afirmar que, para o intervalo de 95% de confiança estimado, não há evidência de falta de ajuste nos modelos propostos.

### Quantificação dos indicadores de tratamento térmico estudados

A indústria de leite e derivados apresenta uma forte demanda para implantação de métodos analíticos para controle de qualidade, sendo o controle do tratamento térmico um dos principais focos de indústrias processadoras de leite para o consumo direto, como é o caso do leite UHT. Portanto, a disponibilização de métodos simples, rápidos, de baixo custo e que sejam capazes de avaliar o processamento térmico adotado, torna-se um viés de parceria muito atrativo entre indústria e academia.

A fim de se demonstrar a confiabilidade dos modelos de regressão ajustados para os métodos espectrofotométricos abordados, o intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ) para os índices de WPNI e HMF foi calculado a partir da equação 2, a qual leva em consideração informações experimentais intrínsecas do conjunto de dados utilizados na construção do modelo.<sup>22</sup>

$$x_0 = (x_e)_0 \pm \frac{ts}{b_1} \left\{ \frac{1}{q} + \frac{1}{n} + \left[ \frac{((x_e)_0 - x_m)^2}{\sum_i (x_i - x_m)^2} \right] \right\}^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

em que:  $x_e$  é o valor médio experimental (amostra);  $t$  é o valor de  $t$  student com  $\alpha = 0,05$  considerando o grau de liberdade do sistema;  $b_1$  é o valor de inclinação da reta do modelo;  $s$  é a raiz da soma quadrática dos resíduos do modelo;  $q$  é o número de réplicas em cada nível do modelo;  $n$  é o número de observações total do modelo;  $x_i$  é o valor de concentração do nível  $i$  do modelo;  $x_m$  é o valor médio teórico dos níveis do modelo.

A aplicação de uma análise estatística descritiva para os índices de WPNI, HMF livre e total torna-se importante para o presente estudo por oferecer uma análise do perfil do mercado produtor quanto ao processamento térmico UHT, uma vez que o mercado produtor é avaliado como um todo a partir do valor médio (e demais parâmetros como desvio-padrão e amplitude) de toda a população observada, podendo oferecer uma visão acerca da padronização do processo UHT no país. Em contrapartida, a PCA pode oferecer dados sobre a padronização do sistema de cada marca selecionada, visto que não se trabalha com valores médios, mas sim com os resultados de cada observação, e sobre a influência dos índices estudados nos diferentes produtos avaliados (teor regular e teor reduzido de lactose).

A Tabela 5 apresenta os valores da estatística descritiva com desvio-padrão, amplitude e desvio-padrão relativo, além do intervalo de confiança, para o índice de WPNI das 63 amostras de leite UHT analisadas.

**Tabela 5.** Análise estatística descritiva do índice de WPNI das amostras comerciais de leite UHT

| Parâmetro              | WPNI<br>(mg WPN mL <sup>-1</sup> leite) <sup>a</sup> |
|------------------------|--|
| Intervalo de Confiança | 0,91; 3,73   |
| Desvio-padrão          | 1,11   |
| Amplitude              | 4,58   |
| Desvio-padrão relativo | 47,7   |

<sup>a</sup>N= 63. Onde N é o número de observações.

O mapeamento do mercado brasileiro atual de leite UHT através deste trabalho demonstra o enquadramento de 75% das amostras avaliadas na classificação de “produto de médio aquecimento” e de 24% na classificação de “produto de alto aquecimento”, de acordo com o *American Dairy Products Institute* (ADPI).<sup>25</sup> O valor médio encontrado de 2,32 mg WPN mL<sup>-1</sup> leite evidencia a classificação da maioria das amostras analisadas como “produto submetido a médio aquecimento”, ainda que o amplo intervalo de confiança demonstre a existência de amostras de “baixo aquecimento” e “alto aquecimento”. Esta classificação, criada pelo ADPI, sugere uma ideia da severidade do tratamento térmico ao qual o produto foi submetido e, conseqüentemente, da intensidade dos danos associados a este tratamento para o produto final. Devido aos inúmeros problemas associados à excessiva exposição do leite ao calor, a indústria deve buscar possíveis alterações de processamento capazes de diminuir a severidade do tratamento térmico oferecido a fim de reduzir perdas nutricionais, manter as características sensoriais do produto e sua estabilidade durante todo período de comercialização. Com base no exposto, os órgãos regulamentadores podem passar a considerar o índice de WPNI como um parâmetro legal a ser monitorado.

A elevada amplitude dos resultados e amplo intervalo de confiança demonstram haver uma heterogeneidade de processamento térmico adotado pelas indústrias responsáveis por cada marca selecionada no presente estudo. Tal despadrão pode ser atribuída a fatores como: i) diferentes tipos de equipamento utilizados, ii) adoção de diferentes combinações para binômios tempo/temperatura, ainda que dentro da faixa estabelecida pela legislação vigente e iii) ocorrência de problemas durante o processamento, implicando em recirculação do produto na linha de produção e, conseqüentemente, intensificando os efeitos causados pelo calor devido à exposição prolongada do produto ao mesmo.

De acordo com Silva<sup>31</sup> a sedimentação é caracterizada como o efeito da perda progressiva de estabilidade proteica no leite submetido ao calor. Este mesmo autor verificou experimentalmente o efeito acumulativo das diversas etapas de aquecimento ao longo do processamento, além de variações nos parâmetros como fluxo do produto no equipamento ou eventual recirculação, as quais tendem a interferir no nível de desnaturação proteica. Portanto, o índice de WPNI torna-se uma ferramenta que pode ser facilmente adotada pela indústria como um atributo de controle e avaliação, capaz de estimar a severidade do tratamento térmico utilizado, oferecendo informações relevantes quanto à estabilidade do produto a ser comercializado.

Informações a respeito do intervalo de confiança e da estatística descritiva para os índices de HMF total e livre são apresentados na Tabela 6. As amostras identificadas como “delactosado” e “regular” foram analisadas separadamente devido ao comportamento distinto evidenciado para ambos os índices determinados.

Segundo Silva<sup>31</sup> e Pereda *et al.*,<sup>33</sup> os valores de HMF livre representam o estágio de desenvolvimento dos compostos durante a ocorrência da RM formados até o momento da análise. Já os valores

**Tabela 6.** Análise estatística descritiva do índice de HMF livre e total das amostras de leite UHT em estudo

| Parâmetro              | HMF livre ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) |                          | HMF total ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) |                          |
|------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|                        | Regular <sup>a</sup>                 | Delactosado <sup>b</sup> | Regular <sup>a</sup>                 | Delactosado <sup>b</sup> |
| Intervalo de Confiança | 2,39; 3,27                           | 6,01; 6,89               | 11,67; 12,39                         | 132,28; 143,22           |
| Desvio-padrão          | 1,27                                 | 3,64                     | 3,40                                 | 66,37                    |
| Amplitude              | 7,12                                 | 12,08                    | 13,06                                | 158,68                   |
| DPR                    | 45,01                                | 56,44                    | 28,20                                | 48,21                    |

<sup>a</sup>N=54; <sup>b</sup>N=9. Onde N é o número de observações.

de HMF total estão relacionados com a estimativa da extensão de formação de HMF, ou seja, o quanto a reação pode prosseguir. Durante a etapa de hidrólise da lactose libera-se monômeros de glicose e galactose; sendo que a glicose apresenta-se mais reativa que a lactose, participando mais ativamente da RM e, conseqüentemente, da formação de intermediários como o HMF.<sup>38</sup>

As amostras do grupo “regular” apresentaram valores de HMF livre e total em consonância com estudos realizados por Silva,<sup>31</sup> o qual verificou que o leite UHT desnatado tende a apresentar valores médios de 1,82  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 14,03  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para HMF livre e total, respectivamente. Todas as amostras com teor reduzido de lactose apresentaram os maiores índices médios de HMF livre e total dentre todas as amostras selecionadas, estando em consenso com a afirmativa acerca da influência da reatividade do substrato na formação de HMF.

A PCA foi utilizada para verificar o comportamento das amostras frente aos índices avaliados, visto que este tipo de análise promove o agrupamento das observações de acordo com a variância das variáveis analisadas (no caso, os índices de WPNI, HMF livre e total).

A formação de inúmeros grupos compostos por poucas observações indica heterogeneidade do grupo amostral, desta forma, é possível traçar um perfil do mercado de leite UHT utilizando concomitantemente os valores dos índices de WPNI, HMF livre e total. Além disso, a PCA possibilita verificar, através do gráfico de pesos (*loadings*), a influência de cada variável nos grupos formados.

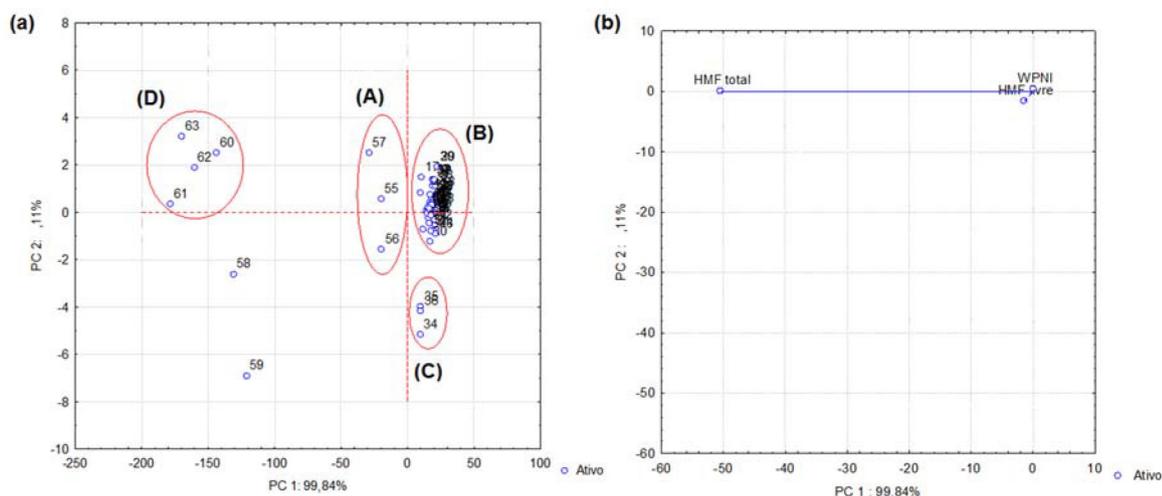
Os valores médios dos índices avaliados para as 63 amostras selecionadas, os quais compõem a base de dados para análise estatística de componentes principais, são apresentados na Tabela 7. O gráfico de *escores* e *loadings* das duas primeiras componentes principais (*principal components* – PC) que conseguiram explicar 99,9% da variância ocorrente no sistema avaliado são representados na Figura 3.

O gráfico de *escores* indica a formação de quatro grupamentos distintos (indicados na Figura 3 como A, B, C e D) e duas amostras não agrupadas. O grupo A é formado por amostras de uma mesma marca de leite submetido ao processo de hidrólise (“delactosado”). O grupo B é composto pela maioria das amostras analisadas, sendo todas com teor regular de lactose, indicando não haver diferença estatística

**Tabela 7.** Valores médios de WPNI, HMF total e HMF livre para todas as amostras de leite UHT analisadas

| Amostra | WPNI <sup>a</sup> | HMF total <sup>b</sup> | HMF livre <sup>c</sup> | Amostra | WPNI <sup>a</sup> | HMF total <sup>b</sup> | HMF livre <sup>c</sup> | Amostra | WPNI <sup>a</sup> | HMF total <sup>b</sup> | HMF livre <sup>c</sup> |
|---------|-------------------|------------------------|------------------------|---------|-------------------|------------------------|------------------------|---------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 1       | 3,72              | 11,74                  | 3,58                   | 22      | 1,94              | 8,97                   | 2,00                   | 43      | 0,73              | 8,69                   | 3,37                   |
| 2       | 3,18              | 20,18                  | 2,39                   | 23      | 1,17              | 12,09                  | 1,93                   | 44      | 2,93              | 8,97                   | 2,49                   |
| 3       | 2,37              | 10,13                  | 2,39                   | 24      | 0,85              | 8,55                   | 3,37                   | 45      | 2,17              | 11,32                  | 2,42                   |
| 4       | 2,00              | 12,19                  | 3,12                   | 25      | 2,74              | 11,43                  | 2,32                   | 46      | 3,21              | 13,88                  | 2,81                   |
| 5       | 1,95              | 11,56                  | 2,60                   | 26      | 4,80              | 9,74                   | 2,70                   | 47      | 2,88              | 9,50                   | 3,19                   |
| 6       | 1,84              | 14,89                  | 2,67                   | 27      | 3,98              | 9,78                   | 1,83                   | 48      | 2,50              | 7,78                   | 2,60                   |
| 7       | 3,44              | 10,02                  | 3,12                   | 28      | 2,78              | 8,52                   | 2,18                   | 49      | 1,66              | 14,86                  | 2,88                   |
| 8       | 3,96              | 11,21                  | 2,00                   | 29      | 3,25              | 7,12                   | 0,95                   | 50      | 0,92              | 13,60                  | 3,09                   |
| 9       | 3,56              | 10,72                  | 1,65                   | 30      | 2,46              | 7,96                   | 0,81                   | 51      | 1,88              | 12,55                  | 3,58                   |
| 10      | 2,21              | 13,49                  | 3,05                   | 31      | 0,75              | 10,48                  | 3,23                   | 52      | 1,64              | 11,46                  | 2,39                   |
| 11      | 2,50              | 8,80                   | 2,70                   | 32      | 0,65              | 13,42                  | 2,42                   | 53      | 2,09              | 12,02                  | 2,95                   |
| 12      | 1,23              | 9,22                   | 3,12                   | 33      | 0,33              | 12,51                  | 2,63                   | 54      | 1,78              | 13,39                  | 2,63                   |
| 13      | 2,60              | 18,20                  | 3,82                   | 34      | 0,25              | 20,12                  | 7,93                   | 55      | 3,36              | 49,77                  | 3,53                   |
| 14      | 1,98              | 11,39                  | 3,09                   | 35      | 0,21              | 19,92                  | 6,84                   | 56      | 3,08              | 49,24                  | 5,63                   |
| 15      | 2,32              | 12,79                  | 2,46                   | 36      | 0,41              | 19,67                  | 6,99                   | 57      | 4,10              | 58,70                  | 1,96                   |
| 16      | 2,83              | 13,89                  | 3,26                   | 37      | 4,14              | 10,30                  | 1,79                   | 58      | 3,18              | 160,64                 | 9,84                   |
| 17      | 3,08              | 19,17                  | 1,69                   | 38      | 2,52              | 8,90                   | 1,65                   | 59      | 3,76              | 150,65                 | 14,04                  |
| 18      | 2,62              | 7,19                   | 1,90                   | 39      | 2,23              | 9,64                   | 1,37                   | 60      | 3,90              | 173,25                 | 5,11                   |
| 19      | 2,03              | 15,70                  | 2,84                   | 40      | 2,57              | 12,13                  | 2,98                   | 61      | 1,00              | 207,92                 | 7,74                   |
| 20      | 1,32              | 13,07                  | 3,96                   | 41      | 3,11              | 12,90                  | 2,25                   | 62      | 0,75              | 190,06                 | 5,63                   |
| 21      | 3,11              | 8,10                   | 2,14                   | 42      | 2,98              | 13,77                  | 2,91                   | 63      | 0,91              | 199,52                 | 4,58                   |

<sup>a</sup>Conteúdo de WPNI em mg WPN mL<sup>-1</sup> leite; <sup>b</sup> conteúdo de HMF total em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; <sup>c</sup> conteúdo de HMF livre em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 3.** Gráfico de (a) escores e (b) loadings de PC 1 versus PC 2 para os índices WPNI, HMF livre e HMF total avaliados em 63 amostras comerciais de leite UHT evidenciando a formação de grupos distintos

significativa entre os processamentos adotados por estas marcas para o produto “regular”, visto que os indicadores de tratamento térmico avaliados se mostraram próximos o suficiente para agrupá-las.

Além disso, a PCA foi capaz de identificar uma única marca classificada como “regular”, a qual se distinguiu de todas as demais marcas com teor regular de lactose, apresentando os maiores índices de HMF livre e total, e o menor índice de WPNI, os quais podem ser facilmente verificados na Tabela 7 (amostras 34, 35 e 36). Estas três amostras (de uma mesma marca comercial – marca X) foram agrupadas no grupo C, permitindo inferir sobre a possível ocorrência de não-conformidades capazes de intensificar os efeitos da ação do calor durante o processamento térmico como, por exemplo, a ocorrência de recirculação do produto, fato este que ocasiona baixo índice de WPNI pelo aumento da desnaturação por ação do calor.

Os índices médios de HMF exibidos pela referida marca X (grupo C) foram  $7,26 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $19,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ , para HMF livre e total, respectivamente, apresentando-se acima dos limites reportados por Silva,<sup>31</sup> sendo o índice de HMF livre normalmente variando de  $(1,0 \text{ a } 4,2) \mu\text{mol L}^{-1}$  e HMF total de  $(10,47 \text{ a } 14,30) \mu\text{mol L}^{-1}$ , para leite UHT com teor regular de lactose. Este mesmo autor verificou índices de HMF livre e total de  $(6,50 \text{ e } 20,60) \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, para leite proveniente de recirculação durante processamento UHT, apresentando-se 2,4 e 1,6 vezes maiores em comparação com amostras de leite sem recirculação. Os valores exibidos pelas amostras da marca X (amostras 34, 35 e 36) apresentam-se de acordo com esta abordagem, permitindo suspeitar *a priori* da ocorrência de recirculação durante o processamento das mesmas.

Para o consumidor, a excessiva exposição do produto ao calor, como ocorre durante o evento de recirculação, gera perdas do valor nutricional devido ao bloqueio de resíduos de lisina, formação de compostos tóxicos precursores dos produtos de glicação avançada (*advanced glycation end-products* – AGE) no organismo humano e redução da digestibilidade do produto e da biodisponibilidade de minerais.<sup>33,39,40</sup> No âmbito industrial, a perda de estabilidade se manifesta na redução da vida de prateleira (*shelf-life*), ocorrência de *recall*, com a retirada do produto do mercado devido à incidência de sedimentação, havendo a consequente redução dos lucros e aumento dos gastos.<sup>31</sup> Todos estes fatores confirmam a importância do uso dos indicadores de tratamento térmico como ferramenta de controle de processo.

O gráfico de pesos (*loadings*), também representado pela Figura 3, indica que os três grupos mais próximos (A, B e C) estão associados por uma maior influência das variáveis WPNI e HMF livre, enquanto o grupo D sofre maior influência da variável HMF total, índice este

que tende a sofrer maiores interferências em razão da reatividade e disponibilidade do açúcar redutor para formação deste indicador.

Como a reatividade do açúcar redutor tende a influenciar o índice de HMF total, verifica-se a possibilidade de utilizar este índice como uma ferramenta capaz de inferir sobre o grau de hidrólise que o produto foi submetido. Deste modo, ainda que as amostras do grupo A (55, 56 e 57) sejam declaradas “delactosadas”, por sofrerem maior influência dos indicadores WPNI e HMF livre não são agrupadas juntamente com as amostras que compõem o grupo D (amostras também declaradas como “delactosadas”), o qual sofre maior influência do índice HMF total, conforme gráfico de pesos. Este comportamento das amostras que compõem o grupo A sugere a possível ocorrência de um menor grau de hidrólise nesta marca, fato este que justificaria sua maior semelhança com os grupos B e C, compostos por amostras com teor regular de lactose, distanciando-se do grupo D, apesar de serem ambos os grupos A e D declarados como “delactosado”.

É possível verificar que o grupo D é formado por três amostras de uma mesma marca com teor reduzido de lactose (amostras 61, 62 e 63 – marca Y) e uma única amostra de outra marca também submetida ao processo prévio de hidrólise enzimática (amostra 60 – marca Z). As demais amostras desta marca Z (58 e 59) apresentaram-se isoladas. Este comportamento pode sugerir uma possível falta de padronização no processo de hidrólise da marca Z em questão (amostras 58, 59 e 60), visto que o grau de hidrólise, ou seja, a concentração de glicose disponível no meio, tende a influenciar principalmente o índice de HMF total devido sua maior reatividade. Neste caso, o gráfico de pesos permite verificar a maior influência do índice de HMF total sob o grupo D e as amostras 58 e 59, confirmando tal hipótese.

## CONCLUSÃO

Métodos espectrofotométricos ganham maior espaço em atividades de controle de rotina por serem discriminatórios, de fácil execução e apresentarem baixo custo de análise, sendo ferramentas importantes para avaliação do processamento ao qual o produto foi submetido. Além disso, o rigor estatístico no qual os resultados foram obtidos permitiu assegurar a capacidade dos modelos propostos em responder à matriz complexa estudada oferecendo respostas confiáveis.

Os índices de WPNI e HMF apresentaram resultados que possibilitam verificar a ocorrência de despadroneamento do processamento UHT do mercado brasileiro atual, além de se mostrarem capazes de inferir sobre eventos de não-conformidades durante processamento térmico, possibilitando estimar acerca da ocorrência de defeitos

no produto final, como, por exemplo, eventos de sedimentação, e por esta razão são muitas vezes denominados como indicadores de tratamento térmico.

A determinação do índice de HMF total pode ser utilizada para discriminação entre produtos com e sem hidrólise enzimática, atuando como uma ferramenta de controle de processo. No entanto, vale ressaltar que estudo com diferentes graus de hidrólise devem ser realizados a fim de se verificar o real comportamento deste indicador frente a variados e controlados teores de lactose.

O estudo dos modelos de regressão propostos para os indicadores WPNI e HMF permitiu avaliar uma matriz complexa como o leite, oferecendo confiabilidade estatística dos dados encontrados, possibilitando obter inferências a cerca do processamento térmico UHT adotado e da qualidade do produto final.

O uso de métodos analíticos quimiométricos como a PCA permitiu tratar de forma simples e eficaz um grande número de dados, facilitando a interpretação e proporcionando uma melhor visualização do comportamento e da influência das variáveis analisadas (índices WPNI, HMF livre e total) no universo amostral.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF, FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro. Este trabalho é um projeto de colaboração de pesquisa de membro da Rede Mineira de Química (RQ-MG) apoiada pela FAPEMIG (Project: CEX - RED-00010-14).

## REFERÊNCIAS

- Walstra, P.; Jenness, R.; *Química y física lactológica*, Editorial Acribia: Zaragoza, 1984, p. 423.
- Kuramoto, S.; Jenness, R.; Coulter, S. T.; Choi, R. P.; *Scientific Journal Series of Minnesota Agricultural Experiment Station* **1958**, 3975, 28.
- Keeney, M.; Bassette, R. J. *Dairy Sci.* **1959**, 42, 945.
- IAL; In *Procedimentos e Determinações Gerais*, Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, 2008, p. 83-160.
- Angelo, P. M.; Jorge, N.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2007**, 66, 1, 1.
- Osawa, C. C.; Felício, P. E.; Gonçalves, L. A. G.; *Quim. Nova*, **2005**, 28, 655.
- Camargo, M. C. R.; Toledo, M. C. F.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2006**, 65, 100.
- Vargas, P. N.; Hoelzel, S. C.; Rosa, C. S.; *Alim. Nutr.* **2008**, 19, 11.
- Santos, M. E.; Demiate, I. M.; Nagata, N.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2010**, 30, 903.
- Belay, A.; Ture, K.; Redi, M.; Asfaw, A.; *Food Chem.* **2008**, 108, 310.
- Biswas, A. K.; Sahoo, J.; Chatli, M. K.; *Food Sci. Technol.* **2011**, 44, 1809.
- Hart, D. J.; John Scott, K.; *Food Chem.* **1995**, 54, 101.
- Morales, F. J.; Romero, C.; Jimenez-Pérez, S.; *Chromatographia* **1992**, 33, 45.
- Gonzalez, M.; Gallego, M.; Valcarcel, M.; *J. Chromatogr. A* **1999**, 848, 529.
- Zhu, D.; Damodaran, S.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, 90, 217.
- Zhang, C.-Y.; Lin, N.-B.; Chai, X.-S.; Li, Z.; Barnes, D. G.; *Food Chem.* **2015**, 183, 169.
- Señoráns, F. J.; Ibañez, E.; *Anal. Chim. Acta* **2002**, 465, 131.
- Li, B.; Zhao, H.; Liu, J.; Liu, W.; Fran, S.; Wu, G.; Zhao, R.; *J. Chromatogr. A* **2015**, 1425, 287.
- Méjean, M.; Brunelle, A.; Touboul, D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 5133.
- De Castro, P. M.; Barra, M. M.; Ribeiro, M. C. C.; Aued-Pimentel, S.; Da Silva, S. A.; de Oliveira, M. A. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1403.
- Barra, P. M. C.; Castro, R. J. C.; de Oliveira, P. L.; Aued-Pimentel, S.; da Silva, S. A.; de Oliveira, M. A. L.; *Food Res. Int.* **2013**, 52, 33.
- Sato, R. T.; Castro, R. J. C.; Barra, P. M. C.; de Oliveira, M. A. L.; *Phytochem. Anal.* **2014**, 25, 241.
- de Oliveira, L. N.; Castro, R. J. C.; de Oliveira, M. A. L.; *J. AOAC Int.* **2015**, 98, 1.
- Damodaran, S.; Fennema, O. R.; Parkin, K. L.; *Química de Alimentos de Fennema*, 4ª ed., ARTMED: São Paulo, 2010.
- American Dairy Products Association In *Bulletin 916*, American Dairy Products Institute: New York, 2009.
- Patel, H. A.; Anema, S. G.; Holroyd, S. E.; Singh, H.; Creamer, L. K.; *Lait* **2007**, 87, 251.
- Perrone, I. T.; Oliveira, L. N.; Faria, L. M. G. C.; *Rev. Inst. Laticínios Candido Tostes* **2008**, 361, 35.
- Pinto, A. P. E. F.; Wolfschoon-Pombo, A.; *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes* **1984**, 39, 9.
- Gaze, L. V.; Costa, M. P.; Monteiro, M. L. G.; Lavorato, J. A. A.; Conte Júnior, C. A.; Raices, R. S. L.; Cruz, A. G.; Freitas, M. Q.; *Food Chem.* **2015**, 169, 471.
- Gaze, L. V.; Oliveira, B. R.; Ferrao, L. L.; Granato, D.; Cavalcanti, R. N.; Conte Júnior, C. A.; Cruz, A. G.; Freitas, M. Q.; *J. Dairy Sci.* **2015**, 98, 1443.
- Silva, P. H. F.; *Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação*, 1ª ed., Templo: Juiz de Fora, 2004, p. 124.
- Morales, F. J.; Romero, C.; Jiménez-Pérez, S.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1570.
- Pereda, J.; Ferragut, V.; Quevedo, J. M.; Guamis, B.; Trujillo, A. J.; *Food Hydrocolloids* **2009**, 23, 1974.
- Mortier, L.; Braekman, A.; Cartuyvels, D.; Van Renterghem, R.; De Block, J.; *Biotechnol., Agron., Soc. Environ.*, **2000**, 4, 221.
- van Boekel, M. A. J. S.; *Food Chem.* **1998**, 62, 403.
- Pimentel, M. F.; Neto, B. B.; *Quim. Nova* **1996**, 19, 268.
- Danzer, K.; Currie, L. A.; *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 993.
- Ferrer, E.; Alegría, A.; Courtois, G.; Farré, R.; *J. Chromatogr. A* **2000**, 881, 599.
- Friedman, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 631.
- Bastos, D. M.; Monaro, E.; Siguemoto, E.; Séfora, M. In *Food Industrial Processes – Methods and Equipment*; Valdez, B., ed.; 2012. p. 281.