

Desenvolvimento de um modelo preditivo para identificação de perda de estabilidade e ocorrência de proteólise em leite UAT

[Development of a predicative model for identification of loss of stability and proteolysis occurrence in UHT milk]

M.C.M. Santos, M.M.O.P. Cerqueira, M.O. Leite, M.R. Souza

Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Este trabalho se propôs a desenvolver um modelo preditivo para identificação de perda de estabilidade e de sedimentação em leite UAT por determinação da atividade enzimática de aminopeptidase no leite por espectrofotometria. Foram analisadas amostras de leite cru, pasteurizado e UAT após envase durante seis meses, na região Sul do Brasil. Acidez, crioscopia, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado e densidade foram analisados nos leites cru e pasteurizado. Amostras de leite cru foram ainda submetidas à análise de contagem de psicrotóxicos e à atividade de aminopeptidase, e amostras de leite UAT estocadas foram analisadas quanto ao grau de proteólise mediante análises sensoriais e atividade de aminopeptidase. Alterações sensoriais foram observadas em tempos de estocagem menores para amostras originadas de leite cru com contagem de psicrotóxicos acima de 10^7 UFC mL⁻¹. Não houve correlação entre a atividade de aminopeptidase e proteólise e também não foi observada correlação significativa entre os parâmetros físico-químicos e a ocorrência de proteólise no leite estocado. O modelo estudado não foi apto para prever perda de estabilidade e ocorrência de proteólise no leite UAT.

Palavras-chave: leite, qualidade, proteólise, UAT

ABSTRACT

The aim of this work was to develop a predictive model for identifying loss of stability and sedimentation in UHT milk by determining the enzymatic activity of aminopeptidase in milk by spectrophotometry. Samples of raw milk, pasteurized and UHT after filling for 6 months in Southern Brazil were analyzed. Acidity, freezing point, fat, total solids, nonfat solids and density were analyzed in raw and pasteurized milk. Raw milk samples were also subjected to psychrotrophic count analysis and aminopeptidase activity and UAT samples of stored milk were analyzed for degree of proteolysis through sensory analysis and aminopeptidase activity. Sensory changes were observed in smaller storage time for samples of raw milk originated with psychrotrophic count above 10^7 CFU ml⁻¹. There was no correlation between aminopeptidase activity and proteolysis and there was also no significant correlation between physicochemical parameters and the occurrence of proteolysis in stored milk. The model was unable to predict loss of stability and occurrence of proteolysis in UHT milk.

Keywords: milk, quality, proteolysis, UHT

INTRODUÇÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa (Brasil, 2014) estima que a produção e o consumo de leite brasileiro deverão crescer em uma taxa anual de 2,6% a 3,4% e de 2,4% a 3,3%, respectivamente,

conforme projeções para o cenário do Agronegócio Brasileiro 2020/2023.

Entretanto, de acordo com a Assessoria Estratégica de Gestão do Mapa (Brasil, 2014), um fator relevante que impede o país de atingir mercados mais exigentes é a qualidade

Recebido em 21 de agosto de 2016

Aceito em 4 de outubro de 2016

E-mail: m_coelly@yahoo.com.br

questionável do produto lácteo brasileiro devido às limitações tecnológicas relacionadas à falta de estabilidade térmica, que têm dificultado a melhoria da qualidade de produtos lácteos e o aumento da vida de prateleira (Silva, 2004). A proteólise no leite UAT (ultra alta temperatura) durante o armazenamento é um exemplo comum de redução da estabilidade, devido à precipitação de minerais, configurando, assim, um problema de qualidade e a rejeição desse produto por parte do consumidor (Vesconsi *et al.*, 2012).

De acordo com Gigante (2004) e Vidal-Martins *et al.* (2005), esse problema pode ser causado por enzimas termooestáveis produzidas por cepas de micro-organismos psicrotróficos, as quais permanecem ativas mesmo após o processamento térmico em alta temperatura. Em ação sinérgica com a plasmina (enzima naturalmente presente no leite), essas enzimas ocasionam a hidrólise das caseínas durante o período de estocagem do leite, também chamado de *shelf-life* (Corassin *et al.*, 2010).

A geleificação, também considerada um problema constante na indústria de lácteos, determina o desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis, assim como alterações na viscosidade, com espessamento do produto, podendo culminar na formação de gel, sem separação de soro, na maioria dos casos (Harwalkar, 1997; Silva, 2004).

Nesse contexto, faz-se necessário diagnosticar procedimentos de ensaio que a indústria láctea possa utilizar para prever a probabilidade de ocorrência das limitações citadas acima, antes do processamento da matéria-prima leite, para que a indústria leiteira atenda as exigências e satisfaça o mercado consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 330 amostras de leite cru, pasteurizado e UAT, provenientes de uma unidade industrial localizada na região Sul do Brasil. Amostras de leite cru foram coletadas em duplicata nos silos de estocagem da indústria, em frascos plásticos estéreis. Amostras de leite pasteurizado foram coletadas no silo de estocagem de leite pasteurizado, em frascos plásticos, sendo correspondentes ao leite cru anteriormente citado. Para essas amostras, foram realizados ensaios de acidez, crioscopia, gordura, extrato seco total – EST, extrato seco

desengordurado – ESD e densidade, segundo a Instrução Normativa nº 68 (Brasil, 2006). Ainda para leite cru, foi realizada a contagem de psicrotróficos (Compendium..., 2001), bem como a atividade enzimática de aminopeptidase (expressa em µg de p-nitroanilina), segundo a metodologia indireta adaptada sugerida por Manzano *et al.* (2005).

Para cada amostra de leite pasteurizado, foram coletadas 12 amostras de leite UAT correspondentes, já envasadas em embalagem estéril cartonada, provenientes de três linhas de envase distintas, as quais produzem, aleatoriamente, leites do tipo integral, semidesnatado e desnatado. Estas foram mantidas estocadas na própria indústria, em ambiente fechado, à temperatura ambiente de 25°C, por 180 dias, e analisadas, no tempo zero e em intervalos de 15 dias, quanto ao grau de proteólise, por meio de análise sensorial qualitativa (aparência, odor, sabor e textura), conforme especificação técnica padrão por tipo de leite definida pela equipe sensorial do laticínio (escore 1: sem alteração de odor/sabor e sem coagulação; escore 2: amargor e sem coagulação; escore 3: sem alteração e coagulado; e escore 4: amargor e coagulado).

Foram comparados a média e o desvio padrão entre os tipos de leite integral, semidesnatado e desnatado, por meio da análise de variância com teste de comparações múltiplas e a correlação de Pearson a 5% de probabilidade. Além disso, foi realizada análise descritiva de tempo entre a leitura da atividade de aminopeptidase e os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados no estudo. Empregou-se, para as análises estatísticas, o *software* de análises de dados e estatística – Stata (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras de leite UAT avaliadas na análise sensorial, 79% foram classificadas como “conforme” (escore 1) e 21% como “não conforme” (escores 2, 3 e 4). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os parâmetros físico-químicos avaliados (acidez, alizarol, pH, extrato seco total, extrato seco desengordurado e densidade) para o leite cru e o pasteurizado, quando comparados com seus respectivos leites UAT classificados como conforme e não conforme (Tab. 1).

Desenvolvimento de um modelo...

Tabela 1. Médias e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos avaliados em leites cru e pasteurizado para cada grupo de UAT conforme e não conforme

| Parâmetros | Leite cru | | Leite pasteurizado | |
|------------------|--------------|------------------|--------------------|------------------|
| | UAT Conforme | UAT Não conforme | UAT Conforme | UAT Não conforme |
| Acidez (°D) | 15,2±0,38 | 15,3±0,45 | 15,1±0,37 | 15,0±0,42 |
| Alizarol (°GL) | 76±0,74 | 75,8±1,23 | 80±0,0 | 80±0,0 |
| Crioscopia (°H) | 0,539±0,003 | 0,538±0,002 | 0,544±0,004 | 0,545±0,003 |
| Gordura (%) | 3,9±0,17 | 3,9±0,13 | 2,8±0,9 | 2,2±1,3 |
| pH | 6,75±0,05 | 6,75±0,05 | 6,8±0,05 | 6,8±0,03 |
| EST (%) | 12,6±0,25 | 12,57±0,28 | 11,4±0,95 | 10,8±1,29 |
| ESD (%) | 8,68±0,11 | 8,67±0,17 | 8,6±0,13 | 8,6±0,14 |
| Densidade (g/mL) | 1030,5±0,38 | 1030,5±0,61 | 1031,2±0,73 | 1031,7±1,24 |

A diferença observada no teor de gordura do leite pasteurizado deve-se ao fato de as amostras pertencerem a leites do tipo integral, semidesnatado e desnatado e já estarem padronizadas para o teor de gordura. Pequenas variações de crioscopia em relação a leite cru e pasteurizado estão associadas à adição de citrato e fosfato, estabilizantes permitidos pela legislação (Brasil, 2002) para suportarem o processo térmico UAT.

Não houve diferença estatística significativa entre a correlação ($P < 0,05$) dos parâmetros

físico-químicos, contagem de psicotróficos e leitura de atividade de aminopeptidase tanto no leite cru quanto no leite pasteurizado (Tab. 2). Lopez Fandiño *et al.* (1993), citados por Cunha, (2001) afirmam que já existem estudos que indiquem que extensão da proteólise é influenciada pelo teor de gordura presente no leite UAT, em que a velocidade da proteólise das amostras de leite desnatadas é superior à de leite integral. Entretanto, neste estudo, não foi possível constatar essa condição.

Tabela 2. Correlação entre parâmetros físico-químicos, contagem de psicotróficos e leitura de atividade de aminopeptidase nos leites cru e pasteurizado

| Parâmetros | Leite cru (n=22) | | Leite pasteurizado (n=20) | |
|---------------|------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Aminopeptidase | Psicotróficos | Aminopeptidase | Psicotróficos |
| Psicotróficos | -0,286 | 1 | -0,198 | 1 |
| Acidez | 0,073 | 0,300 | 0,032 | 0,287 |
| Alizarol | -0,137 | -0,077 | - | - |
| Crioscopia | 0,154 | -0,015 | 0,097 | -0,048 |
| Gordura | -0,381 | -0,113 | -0,27 | 0,207 |
| pH | -0,04 | 0,158 | -0,206 | 0,274 |
| EST | -0,237 | -0,157 | -0,242 | 0,226 |
| ESD | -0,014 | -0,170 | 0,206 | 0,192 |
| Densidade | 0,083 | -0,163 | 0,348 | -0,084 |

Foi observada média de $9,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ para amostras de leite cru que deram origem a leites UAT classificados como conforme, e média de $15,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ para amostras de leite cru que deram origem a leites UAT classificados como não conforme.

Considerando as amostras conforme, observa-se (Tab. 3) que o índice de conformidade para as amostras de leite integral, semidesnatado e

desnatado foi, respectivamente, 85%, 17% e 67%. Já para as amostras não conforme, verifica-se que o maior índice (83%) ocorreu para o leite tipo semidesnatado, o que pode ser explicado pelo fato de as 12 amostras de leite semidesnatado UAT estocadas pertencerem a um mesmo lote, no qual a contagem de psicotróficos no leite cru correspondente foi de $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, enquanto a média dos outros tipos de leite foi de $1,4 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Tabela 3. Índice de conformidade segundo análise sensorial por tipo de leite UAT

| Tipo de leite | Total de amostras UAT | Amostras conforme | Amostras não conforme | Índice de não conformidade por tipo UAT |
|---------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|---|
| Integral | 203 | 172 | 31 | 15% |
| Desnatado | 36 | 24 | 12 | 33% |
| Semidesnatado | 12 | 2 | 10 | 83% |

Segundo Cunha (2001), maior rapidez no aparecimento do amargor e a caracterização dessas amostras como não conforme, mais precocemente (antes dos 45 dias de estocagem) do que as dos outros grupos, estão associados à contaminação por psicrotróficos.

Apesar do menor número de amostras analisadas de leite semidesnatado, verificou-se maior ocorrência de não conformidade nesse tipo de leite UAT.

De acordo com os escores sensoriais (1 a 4) sugeridos no estudo, observou-se (Tab. 4) que contagens de psicrotróficos no leite cru acima de $9,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ foram suficientes para

alterar o padrão sensorial do leite UAT final e que não necessariamente, características relacionadas à alteração de sabor, como amargor, deverão vir acompanhadas da presença de coagulação. Segundo Datta e Deeth (2003), a k-caseína localizada na superfície da micela de caseína é preferencialmente hidrolisada, e essa hidrólise causa o desenvolvimento de gosto amargo e induz o aumento da viscosidade, com eventual formação de coagulação do leite UAT/UHT (Cunha, 2001), quando este é submetido a prolongado período de armazenamento. Isso pode explicar a não ocorrência de coagulação nas amostras classificadas no escore 2, apesar da contagem de psicrotróficos de $1,75 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Tabela 4. Contagem média de psicrotróficos por escala sensorial de classificação do leite UAT

| Escore | Características | Amostras (Nº e %) | Contagem de psicrotróficos (UFC x mL ⁻¹) |
|--------|--------------------------------|-------------------|--|
| 1 | Sem alteração e sem coagulação | 198 (79%) | $9,5 \times 10^7$ |
| 2 | Amargor e sem coagulação | 11 (4%) | $1,75 \times 10^8$ |
| 3 | Sem alteração e coagulado | 11 (4%) | $1,18 \times 10^8$ |
| 4 | Amargor e coagulado | 31 (12%) | $1,57 \times 10^8$ |

Nos ensaios de análise sensorial, notaram-se diferentes intensidades para o atributo amargor, com percepção mais intensa nas amostras de leites semidesnatado e desnatado, provavelmente atribuído ao menor teor de gordura, que proporciona melhor percepção do amargor (média de gordura de 3,1% para leite integral, 1,1% para semidesnatado e 0,2% para desnatado). Entretanto, esse atributo foi considerado neste estudo apenas como um fator qualitativo, indicando a presença ou ausência de amargor. Observa-se, ainda, que todas as amostras classificadas no escore 4 apresentaram essas características no intervalo entre 90 – 180 dias de estocagem, alterações esperadas decorrentes do período final de vida útil do produto, estimado para 120 dias, em que ocorre a

desestabilização das micelas de caseína induzida por modificações físico-químicas (Cunha, 2001). Fernandes *et al.* (2012) encontraram correlações significativas entre psicrotróficos e a fração k-caseína, indicando que quanto maior o número de bactérias psicrotróficas no leite cru, maior foi a quantidade de frações k-caseína encontradas no leite longa vida ao final da vida de prateleira.

A contagem de psicrotróficos, em média, variou de $1,26 - 2,1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e $4,3 \times 10^7$ a $1,08 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ para leites crus correspondentes aos leites UAT não conforme e conforme, respectivamente (Fig. 1). A absorvância de aminopeptidase correspondente a μ g de p-nitroanilina variou de 0,463 – 0,531 (2,82 – 3,24 μ g de p-nitroanilina) e de 0,499 –

Desenvolvimento de um modelo...

0,675 (3,04 – 4,12µg de p-nitroanilina) para amostras não conforme e conforme, respectivamente. Valores semelhantes e/ou muito próximos de leitura foram observados para leites conforme e não conforme, diferenciando o grupo

apenas na contagem de psicotróficos, o que indica que leituras de aminopeptidase não devem ser utilizadas como classificatórias para se prever o tempo e o padrão (conformidade ou não conformidade) de leites UAT.

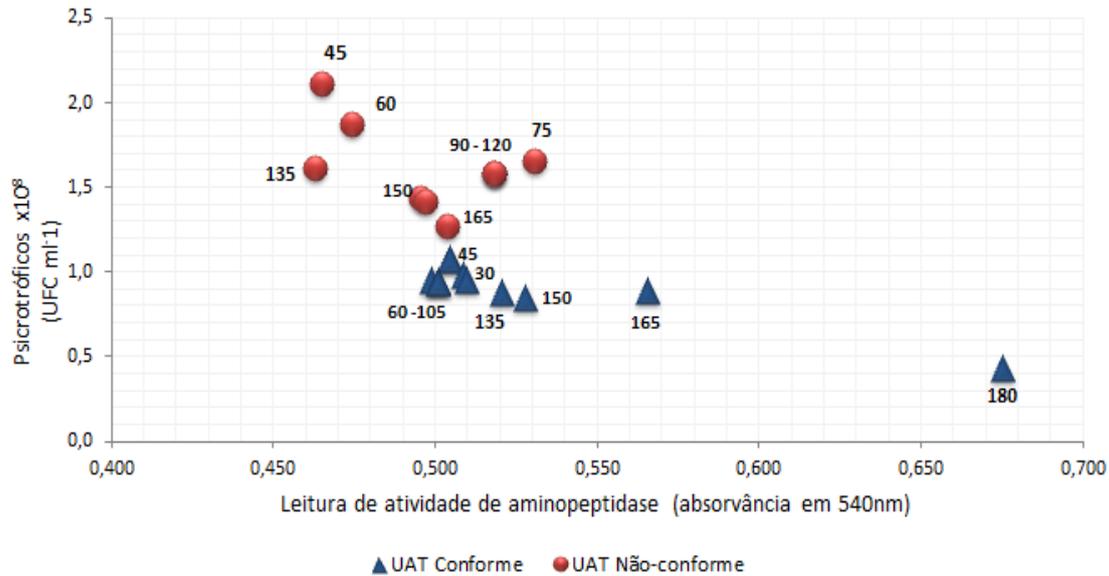


Figura 1. Médias de leitura de aminopeptidase (absorvância) e contagem de psicotróficos de leites cru e tempo de análise de leite UAT correspondente.

A leitura da atividade de aminopeptidase (absorvância em 540nm) nas amostras de leite cru que corresponderam apenas aos leites UAT não conforme (Fig. 2) foi detectada entre 0,188 – 0,814 (1,14 – 4,97µg de p-nitroanilina), e a contagem de psicotróficos observada para o mesmo grupo foi de $6,0 \times 10^6$ a $2,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Amostras de leites desnatado e semidesnatado apresentaram amargor com 45 dias de estocagem e contagem de psicotróficos de $2,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e $2,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Vidal-Martins *et al.* (2005) também observaram contagens médias acima de 10^7 UFC mL⁻¹ e aumento da proteólise no decorrer do armazenamento após 60 dias de estocagem, provavelmente relacionados à presença de proteases de bactérias psicotróficas do leite cru.

Na indústria em que foi realizado o presente estudo, a partir de 120 dias já eram esperadas

características que tornavam o leite UAT integral não conforme, segundo a especificação técnica do produto que define o prazo de vida de prateleira em 120 dias. Entretanto, algumas amostras de leite integral apresentaram alteração sensorial com apenas 60,70 e 90 dias de estocagem.

Cunha (2001) e Manzano *et al.* (2005) consideram contagens de psicotróficos acima de 10^6 UFC mL⁻¹ suficientes para garantir níveis significativos de enzimas extracelulares e problemas decorrentes de sua presença. Considerando apenas as amostras não conforme (Fig. 2), a média de psicotróficos no leite cru correspondente foi de $2,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e de $2,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, respectivamente, para leites desnatado e semidesnatado, contagens que podem justificar o índice de não conformidade nas amostras de leite UAT avaliadas.

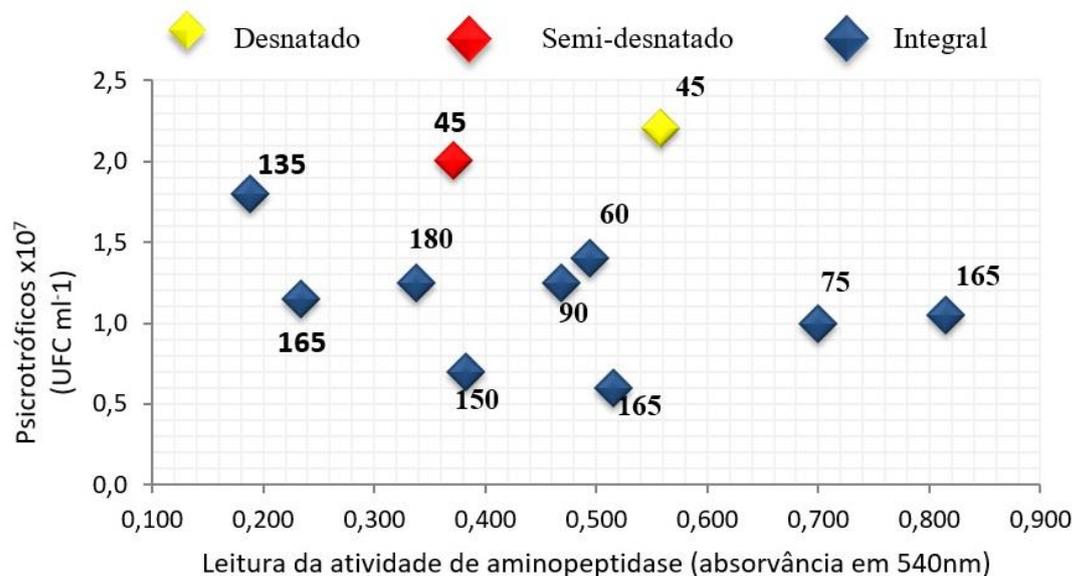


Figura 2. Médias de leitura de aminopeptidase (absorvância) e contagem de psicrotróficos de leite cru e tempo de análise de leite UAT correspondente, em que foi observada a primeira alteração sensorial para os diferentes tipos de leite.

De acordo com Vidal-Martins *et al.* (2005) e Fernandes *et al.*, (2012), altas contagens sugerem que as alterações sensoriais observadas são decorrentes de atividades enzimáticas, principalmente enzimas extracelulares, particularmente lipases e proteases, produzidas por essas bactérias contaminantes do leite, ainda que a vida útil do produto esteja diretamente relacionada com a qualidade higiênica da matéria-prima.

CONCLUSÕES

Os parâmetros físico-químicos de qualidade do leite cru não influenciaram a perda de estabilidade e o grau de proteólise do leite UAT. As alterações sensoriais de leites UAT relacionaram-se à maior contagem de psicrotróficos no leite cru e foram detectadas com períodos curtos de estocagem e relacionadas a altas contagens de psicrotróficos em leite cru. A atividade da aminopeptidase não foi capaz de prever ocorrência de proteólise em leite UAT e não apresentou correlação com a contagem de psicrotróficos em leite cru.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Projeções do Agronegócio, Brasil 2013/14 a 2022/23. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: 10 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 set. 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial da União*, 14 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em: jan. 2015.

- COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. Chapter 6, p.53-67.
- CORASSIN, C.H.; ROSIM, R.E.; OLIVEIRA, C.D. Atividade de plasmina e plasminogênio no leite longa vida com alta e baixa contagem de células somáticas durante o armazenamento. *Ciênc. Rural*, v.40, p.2588-2592, 2010.
- CUNHA, M.F. Revisão: leite UHT e o fenômeno de gelatinização. *Bol. CEPPA*, v.19, p.341-351, 2001.
- DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v.36, p.173-182, 2003.
- FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S. *et al.* Relação entre psicrotróficos e frações de caseína do leite longa vida durante o armazenamento. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, v.14, p.227-230, 2012.
- GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J.W., CARVALHO, M.P., SANTOS, M.V. *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo, RS: UPF, 2004. 331p.
- HARWALKAR, V.R. Age gelation of sterilized milks. In: FOX, P.F. *Advanced dairy chemistry*. London: Chapman & Hall, 1997. v.1, p.691-734.
- LOPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; CORZO, N.; RAMOS, M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 60, n. 3, p. 339-347, 1993.
- MANZANO, S. A rapid method for the estimation of the microbiological quality of refrigerated raw milk based on the aminopeptidase activity of Gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.*, v.15, p.79-84, 2005.
- SILVA, P.H.F. Leite UHT: *Fatores determinantes para sedimentação e gelificação*. Juiz de Fora: Oficina de Impressões Gráficas e Editora, 2004. 128p.
- STATA 12 statistical software. [São Paulo]: College Station, TX 2012.
- VESCONSI, C.N.; VALDUGA, A.T.; CICHOSKI, A.J. Sedimentação em leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. *Ciênc. Rural*, v.42, p.730-736, 2012.
- VIDAL-MARTINS, A.M.; SALOTTI, B.M; ROSSI JUNIOR, O.D. *et al.* Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciênc. Technol. Aliment.*, v.25, p.698-704, 2005.