



Ajuste metodológico para triagem de atividade proteásica em leite desnatado e integral

Marília Penteado Stephan¹
Sidinéa Cordeiro de Freitas²

Introdução

A existência de métodos espectrofotométricos para a quantificação de proteínas em leite é uma realidade e tem sido utilizada tanto para absorção no infravermelho (BARBANO; DELLAVALLE, 1987) como no ultravioleta (CHURCH et al., 1983). A aplicação desta última técnica, somada a estratégia utilizada por Le, Data e Deeth (2006), utilizando precipitação com ácido tricloroacético (TCA) para estudos de peptídios e aminoácidos livres, permite que se proponha uma estratégia para estudo de leite não ácido, não mastístico contendo caseína instável, que tem sido citada em muitas bibliografias (OLIVEIRA; TIMM, 2006; TIMM et al., 2002). A prova do álcool é uma técnica simples de análise feita pela indústria láctea com o objetivo de avaliação indireta do pH do leite; quando este se apresentar na faixa ácida, há a perda da estabilidade e, conseqüentemente, precipitação da caseína (BARROS, 2001). Entretanto, este teste ainda apresenta limitações. A existência de um leite não-ácido com instabilidade da caseína (LINA) representa um prejuízo ao produtor pelo fato deste ser descartado após precipitação da caseína pelo teste do álcool. Alterações desta natureza foram relatadas pela literatura em diferentes regiões do mundo, tais como, Irã (SOBHANI; VALIZADEH; NASERIAN, 2002), Cuba (PONCE CEBALLO; HERNÁNDEZ, 2001), Uruguai (BARROS et al., 1999) e no Brasil (DONATELE et al., 2001). As causas da existência do leite LINA ainda não foram

totalmente esclarecidas, mas o estudo da atividade proteásica pode ser esclarecedor no caso da existência de proteólise em resposta à presença de população microbiana ou pela existência de Plasmina, uma enzima que faz parte do "pool" protéico do leite (LE; DATA; DEETH, 2006). Estes mesmos autores descreveram um método de análise de peptídios e aminoácidos oriundos da proteólise da caseína usando ácido tricloroacético (TCA), como agente precipitante das proteínas, e posterior análise dos aminoácidos e peptídios presentes no filtrado. Entretanto, a necessidade de utilização de cromatografia líquida torna o método demorado e oneroso. A acidez não é o único fator que provoca instabilidade da caseína. Processos inflamatórios na glândula mamária aumentam a concentração de plasmina no leite, cuja ação hidrolítica sobre a caseína leva à diminuição da estabilidade (PHILPOT, 1998). O presente trabalho demonstra que pode haver a substituição da etapa de utilização de um sistema de cromatografia líquida pela uso de um espectrofotômetro, utilizando-se, para isto, a técnica de espectrofotometria de absorção no ultravioleta, que se baseia na propriedade dos aminoácidos aromáticos absorverem a luz na região do ultravioleta (280 nm). Este método tem sido também utilizado no doseamento das proteínas do leite. Entretanto, as amostras de leite não podem ser utilizadas como se apresentam, por serem muito concentradas, há necessidade que as mesmas sejam bastante diluídas (CHURCH et al., 1983).

¹ Farm. Bioq., D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: stephan@ctaa.embrapa.br

² Eng. Química., D.Sc., Embrapa Agroindústria de Alimentos. E-mail: sidi@ctaa.embrapa.br

Quantificação de Tirosina

Para análise de tirosina livre, seguiu-se o protocolo de Chang-Lee et al. (1989). A 25 mL de leite foram adicionados 25 mL de ácido tricloroacético 20% (TCA) e a solução foi colocada em banho de gelo durante 30 minutos. Após este período, foi feita uma filtração em papel de filtro e a absorbância dos filtrados obtidos após a precipitação com TCA foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 280 nm. Os padrões de tirosina foram preparados utilizando tirosina a partir da concentração de 320 mM. Alíquotas de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL foram utilizadas e o volume levado a 5,0 mL com água destilada. As soluções de padrões geradas ficaram com as seguintes concentrações (em mM): 32, 64, 128, 192 e 256. Na Figura 1, está apresentada a curva padrão gerada com sua respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

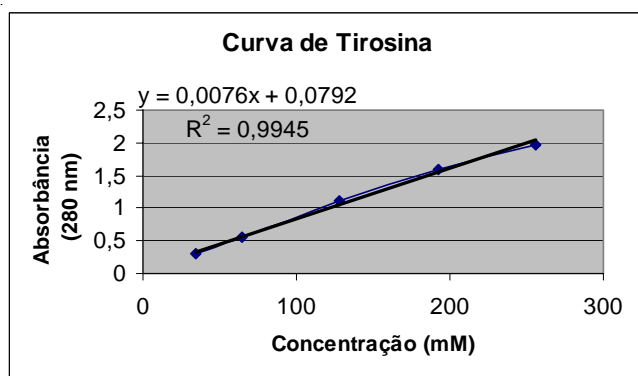


Fig. 1. Variação quanto ao tamanho do fruto (Tomates cultivar "Debora Plus", tipo 1 A) e quanto a sua posição dentro das caixas.

Utilização de leite tipo longa vida (integral e desnatado) para triagem de atividade proteásica, através de quantificação de níveis de tirosina livre.

Nesta parte do trabalho, o objetivo foi mostrar o ajuste metodológico para avaliação de atividade proteolítica em leite tipo longa vida (desnatado e integral), através da quantificação de tirosina livre. A importância deste trabalho está relacionada com a obtenção de um método analítico rápido e preciso para identificação de um leite tipo LINA (leite instável não ácido). Este leite instável se caracteriza por apresentar alterações nas suas características físico-químicas (OLIVEIRA; TIMM, 2006). Como estratégia, buscou-se no mercado um leite de qualidade reconhecida, visando obter-se a caracterização de uma amostra considerada como padrão de referência de um leite sem atividade proteolítica. Para este ajuste metodológico inicial, foram utilizadas 5 amostras de um mesmo lote de leite integral e desnatado (tipo longa vida), comercializadas em supermercados do Rio de Janeiro. A presença de peptídios e aminoácidos foi quantificada através de monitorização de tirosina livre. Em todas as amostras foi obtido filtrado límpido contendo concentrações de

tirosina que variaram de 0,352 a 0,402 mg/mL (leite desnatado) e de 0,380 a 0,430 mg/mL (leite integral) (Tabela 1). Estes resultados servirão como padrão de identidade de um leite com qualidade ideal para consumo e como amostra de referência para estudo comparativo com outros produtos a serem estudados. A facilidade de utilização de um espectrofotômetro mostra a praticidade e rapidez do método.

Tabela 1. Níveis de tirosina livre (atividade proteásica) presente em leite tipo longa vida (integral e desnatado)*

LEITE	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	AMOSTRA 3	AMOSTRA 4	AMOSTRA 5
INTEGRAL	0,352	0,366	0,356	0,402	0,386
DES NATADO	0,380	0,414	0,400	0,420	0,430

*Valores de tirosina expressos em mg/mL.

Estudo do efeito da adição de uma protease sobre os níveis de liberação de tirosina livre em leite integral e desnatado

Uma alta frequência de casos de leites oriundos de animais sadios que reagem positivamente à prova do álcool, sem apresentarem acidez titulável elevada, ainda é observada. Neste trabalho, teve-se como objetivo verificar o comportamento do leite tratado com protease no que concerne a valores de tirosina livre (280 nm) e análise de turbidez (560 nm). Para estes ensaios, foram utilizadas 5 amostras de um mesmo lote de leite longa vida (desnatado e integral), adquirido em supermercado e incubado durante dois dias à temperatura ambiente. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de leite, sendo que, para o tratamento com protease, foram adicionados 100 mL de uma solução contendo 5 mg desta enzima oriunda de *Bacillus licheniformis*. Para o tratamento sem protease, obteve-se, no filtrado, valores médios de tirosina de 0,38 mg/mL e 0,53 mg/mL, para o leite desnatado e integral, respectivamente. Para o tratamento com adição de protease, estes valores foram maiores e apresentaram um aumento de aproximadamente 100% (0,80 mg/mL) para leite desnatado e de 73% (0,77 mg/mL) para leite integral (Tabela 2). Adicionalmente à leitura em espectrofotômetro a 280 nm, foi também avaliada a turbidez da amostra em comprimento de onda de 560 nm. Altos valores de turbidez foram observados (variando de 0,22 a 0,84) para o tratamento com protease, enquanto que, para as amostras do tratamento sem protease, estes não foram superiores a 0,008 (Tabela 3). Pode-se concluir que apenas duas medições espectrofotométricas, no UV a 280 nm e no visível a 560 nm, diferenciam um leite submetido à ação de uma protease de outro livre da ação desta enzima.

Tabela 2. Análise comparativa dos teores de tirosina livre em leite longa vida (integral e desnatado) após 2 dias de incubação e tratados com e sem protease*

LEITE				
AMOSTRAS	INTEGRAL		DESNATADO	
	COM PROTEASE	SEM PROTEASE	COM PROTEASE	SEM PROTEASE
1	0,982	0,578	0,648	0,336
2	1,026	0,670	1,048	0,344
3	0,696	0,412	0,854	0,348
4	0,734	0,500	0,836	0,332
5	0,443	0,500	0,598	0,522

*Valores de tirosina livre expressos em mg/mL

Tabela 3. Análise comparativa dos valores de absorvância observados em amostras de leite longa vida (integral e desnatado) incubados após 2 dias e tratados com e sem protease*

LEITE				
AMOSTRAS	INTEGRAL		DESNATADO	
	COM PROTEASE	SEM PROTEASE	COM PROTEASE	SEM PROTEASE
1	0,60	0,006	0,53	0,003
2	0,84	0,008	0,70	0,006
3	0,18	0,007	0,79	0,006
4	0,22	0,006	0,76	0,007
5	0,39	0,005	0,54	0,008

*Valores expressos em leitura de densidade ótica (560 nm)

Considerações finais

A importância deste trabalho está relacionada com a possibilidade de se ajustar um método analítico rápido e preciso para identificação de um leite não ácido, não mastídico, com instabilidade da caseína e contendo parâmetros relacionados com a atividade proteásica. A facilidade de acoplar a precipitação das proteínas com TCA, junto com a filtração e as duas leituras em espectrofotômetro (280 e 560 nm), mostrou a praticidade e rapidez do método no que concerne a garantia da ausência de atividade proteásica, servindo como um parâmetro adicional para a garantia de qualidade de leite.

Referências Bibliográficas

- BARBANO, D. M.; DELLAVALLE, M. E. Rapid method for determination of milk casein content by infrared analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 8, p. 1524-1528, aug. 1987.
- BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2001. p. 46-60.
- BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A.; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. *Prácticas Veterinarias*, v. 9, p. 315-318, 1999.

CHANG-LEE, M. V.; PACHECO-AGUILAR, R.; CRAWFORD, L.; LAMPILA, L.E. Proteolytic activity of surimi from pacific whiting (*Merluccius productus*) and heat-set gel texture. *Journal of Food Science*, v. 54, n. 5, p. 1116-1119, sep.1989.

CHURCH, F. T. A.; SWAISGOOD, H. E.; PORTER, D. H.; CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and in isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 66, p. 1219-1227, 1983.

DONATELE, D. M.; FOLLY, M. M.; VIEIRA, L. F. P.; TEIXEIRA, G. N. Estudo da relação da prova do álcool 72% (v/v) com pH, grau Dornic e contagem de células somáticas do leite de vacas do município de campos do Goytacazes, RJ In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28., 2001, Salvador. *Anais...* Salvador: SBMV, 2001.

LE, T. X.; DATA, N.; DEETH, H. C. A sensitive HPLC method for measuring bacterial proteolysis and proteinase activity in UHT milk. *Food Research International*, v. 39, n. 7, p. 823-830, aug. 2006.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 2, p. 259-263, abr./jun. 2006.

PHILPOT, W. N. Programas de qualidade do leite no mundo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 1-6.

PONCE CEBALLO, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2001. p. 61-72.

SOBHANI, S.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science*, v. 80, suppl 1, p. 59, 2002.

TIMM, C. D.; OLIVEIRA, D. S.; ARRIADA, E. O.; MORAES, C. M.; ROOS, T. B.; GONZALEZ, H. L. Estabilidade protéica do leite produzido no município de Santa Vitória do Palmar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. *Anais...* Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2002. 1 CD-ROM.

Comunicado Técnico, 119

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
 23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 2410-1090 / 2410-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2007): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta.*
Membros: *Marcos José de Oliveira Fonseca, Marília Penteadó Stephan, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy RenataTorrezan, Soraya Pereira e André Luis do Nascimento Gomes.*
Secretárias: *Renata Maria Avilla Paldês e Célia Gonçalves Fernandes.*
Revisão editorial: *Soraya Pereira.*
Revisão de texto: *Comitê de Publicações.*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo.*
Editoração eletrônica: *André Luis do N. Gomes e Filipe Loureiro Rebelo.*

Expediente