



# CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PERFIL PROTEICO DE LEITES SUBMETIDOS À DIFERENTES TRATAMENTOS TÉRMICOS

**Palavras-Chave:** PROTEÍNAS LÁCTEAS, TRATAMENTO TÉRMICO, ELETROFORESE

**Autores(as):**

**ANA BEATRIZ FABENI, FEA - UNICAMP**

**ORLANDO CÉLIO CAMPOVILLA JÚNIOR, FEA - UNICAMP**

**Dr<sup>a</sup>. DÉBORA PARRA BAPTISTA (coorientadora), FEA - UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MIRNA LÚCIA GIGANTE (orientadora), FEA - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

O leite bovino é composto por aproximadamente 3,5% de proteínas. As proteínas do leite podem ser fracionadas em dois grupos bem definidos: a fração que precipita após acidificação do leite a pH 4,6 a 20 °C, que corresponde a aproximadamente 80% do total de proteínas do leite e é conhecida como caseína, e as proteínas que permanecem solúveis sob essas condições, as proteínas do soro (FARRELL et al, 2004; WALSTRA et al., 2006).

As caseínas estão presentes no leite na forma de estruturas coloidais denominadas micelas de caseína compostas pelas frações  $\alpha_{s1}$  (12-15 g.L<sup>-1</sup>),  $\alpha_{s2}$  (3-4 g.L<sup>-1</sup>),  $\beta$  (9-11 g.L<sup>-1</sup>) e  $\kappa$ -caseína (2-4 g.L<sup>-1</sup>). Dentre as proteínas do soro, a  $\beta$ -lactoglobulina (2-4 g.L<sup>-1</sup>) e a  $\alpha$ -lactoalbumina (0,6-1,7 g.L<sup>-1</sup>) são as mais abundantes (FARRELL et al, 2004).

Na indústria láctea moderna, o leite é quase sempre submetido a algum tratamento térmico já que o processo térmico do leite é fundamental para a estabilidade microbiológica de leite e produtos lácteos. A aplicação de calor pode resultar em alterações nos constituintes do leite. As proteínas do soro são proteínas globulares, com bastante estruturas secundárias e terciárias, e, portanto, susceptíveis à desnaturação pela ação do calor. A desnaturação das proteínas do soro resulta na exposição de grupos sulfidril e em interações entre proteínas do soro, especialmente  $\beta$ -lactoglobulina, e  $\kappa$ -caseínas na superfície das micelas de caseína (FOX et al., 2015), o que modifica a forma como essas proteínas se comportam no sistema físico-químico do leite.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar leites comerciais submetidos à diferentes tratamentos térmicos (pasteurização e processo UHT) quanto à composição físico-química e ao perfil proteico utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliar a formação do complexo  $\beta$ -lactoglobulina- $\kappa$ -caseína.

## **METODOLOGIA:**

Foram analisadas 10 amostras de leite integral de diferentes marcas, sendo 4 amostras de leite pasteurizado e, as outras 6, de leite UHT, todas comercializadas na cidade de Campinas (SP). Para viabilizar a avaliação da variabilidade da composição do leite produzido em diferentes épocas do ano, 3 lotes de leite foram avaliados, seguindo o cronograma abaixo:

- Lote 1: 10 amostras de leite de diferentes marcas produzidas entre setembro e outubro de 2022.
- Lote 2: 10 amostras de leite de diferentes marcas produzidas entre janeiro e fevereiro de 2023.
- Lote 3: 10 amostras de leite de diferentes marcas produzidas entre maio e junho de 2023.

Os leites foram caracterizados quanto ao pH, acidez titulável, densidade através do lactodensímetro com correção de temperatura, gordura pelo método de Gerber, teor de sólidos totais por secagem em estufa a 105 °C e nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2006). O teor de proteína foi determinado multiplicando-se o nitrogênio total por 6,38.

Para avaliação do perfil proteico, 4 amostras de leite pasteurizado e 4 amostras de leite UHT foram analisadas utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) descrita por Laemmli (1970), em condições redutoras e não redutoras. Os géis foram digitalizados e legendas foram adicionadas para identificação de amostras e bandas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

A composição físico-química média dos leites de cada lote avaliado são apresentados na Tabela 1. Os resultados obtidos nas análises físico-químicas foram comparados com as legislações vigentes: a Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018, que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado (Capítulo II) (BRASIL, 2018); e a Portaria Nº 370, de 4 de setembro de 1997, que estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT) (BRASIL, 1997).

Os leites pasteurizados analisados em todos os lotes se enquadraram nas exigências da IN Nº 76 para leite pasteurizado integral que estabelece densidade relativa a 15 °C entre 1,028 e 1,034 g/mL, acidez titulável entre 0,14 a 0,18 g ácido láctico/100 mL, teor de gordura mínimo de 3%, teor de sólidos não-gordurosos mínimo de 8,4% e mínimo de 2,9% de proteína tota (BRASIL, 2018). Os leites UHT analisados nos três lotes também se enquadraram nas exigências de sua respectiva legislação vigente, a Portaria Nº 370, que estabelece teor de gordura mínimo de 3%, teor de sólidos não-gordurosos mínimo de 8,2% e acidez titulável entre 0,14 a 0,18 g ácido láctico/100 mL (BRASIL, 1997).

A legislação brasileira não estabelece valores para pH de leite pasteurizado ou UHT, mas os valores obtidos estão próximos a 6,7, valor de pH normal do leite à temperatura ambiente de acordo com Walstra et al. (2006).

Em geral, leites de diferentes lotes apresentaram composição média próxima (Tabela 1), possivelmente porque se tratam de leite de mistura, nos quais variabilidades da composição são minimizadas.

**Tabela 1.** Composição físico-química média dos leites dos 3 lotes analisados (n=10).

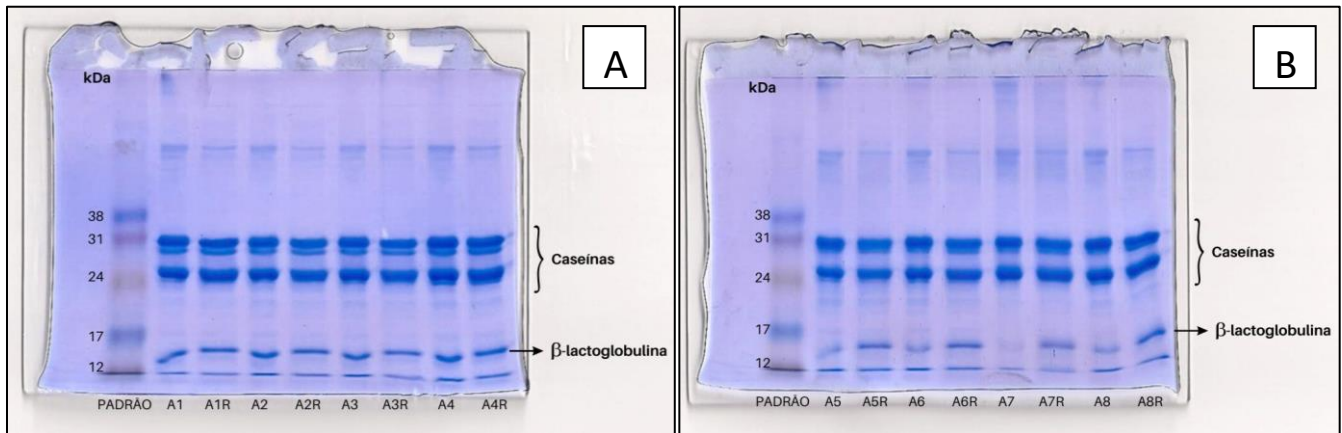
	<b>Lote 1</b> (set. e out./2022)	<b>Lote 2</b> (jan. e fev./2023)	<b>Lote 3</b> (maio e jun./2023)
Densidade relativa a 15 °C (g/mL)	1,0314 ± 0,0007	1,0301 ± 0,0007	1,0308 ± 0,0013
pH	6,69 ± 0,07	6,78 ± 0,09	6,85 ± 0,11
Acidez (%)	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Gordura (%)	3,44 ± 0,43	3,54 ± 0,44	3,33 ± 0,30*
Extrato seco total (%)	12,25 ± 0,49	12,24 ± 0,60	12,04 ± 0,30*
Proteína total (%)	3,45 ± 0,15	3,44 ± 0,22	3,20 ± 0,24

\*média de 9 amostras.

A Figura 1 apresenta o perfil eletroforético de 4 amostras de leite pasteurizado (Figura 1A) e 4 amostras de leite UHT (Figura 1B) obtidos através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras e não redutoras. A utilização de agentes redutores no preparo de amostra permite avaliar o papel de ligações dissulfeto (-S-S-) intra e intermoleculares na agregação de proteínas do leite. Isso é possível, pois a redução do enxofre promove a clivagem das ligações dissulfeto (SHARMA et al., 2021), podendo levar a alteração do perfil eletroforético em relação a amostra não submetida a tais condições. As Figuras 1A e 1B apresentam um perfil característico de proteínas do leite, com a separação das frações caseicas na faixa de 20 a 30 kDa e proteínas do soro (WALSTRA, 2006).

Quando o leite é submetido a tratamento térmico intenso, proteínas do soro são desnaturadas, resultando na exposição de grupos sulfidríla e na consequente interação entre proteínas do soro, especialmente  $\beta$ -lactoglobulina e  $\kappa$ -caseínas. A formação do complexo  $\beta$ -lactoglobulina- $\kappa$ -caseína na superfície das micelas de caseína altera o comportamento das micelas no leite. A formação desse complexo é desejável na fabricação de alguns produtos como iogurte pois favorece a formação de uma rede proteica com alta capacidade de retenção de água, mas é indesejável na fabricação de queijos pois atrapalha a ação da enzima coagulante durante a fabricação desse produto (FOX et al., 2015). Ao avaliar os géis obtidos é possível observar perfis proteicos muito semelhantes para as amostras de leite pasteurizado em condições redutoras e não redutoras (Figura 1A). No entanto, os leites submetidos ao processamento UHT apresentaram comportamento diferente, com aumento na intensidade das bandas de  $\beta$ -lactoglobulina em condições redutoras, quando comparadas às condições não redutoras (Figura 1B). Esse comportamento está possivelmente associado à presença do complexo  $\beta$ -lactoglobulina- $\kappa$ -caseína no leite UHT que se dissocia pela ação do agente redutor, resultando em bandas de  $\beta$ -

lactoglobulina mais intensas nas condições redutoras. Dessa forma, a análise demonstrou diferenças entre as amostras de leite pasteurizado e UHT, possivelmente associadas à diferença na intensidade do tratamento térmico aplicado: 72-75°C/15-20s no caso da pasteurização e 130-150°C/3-5s no caso do processo UHT (FOX et al., 2015; BRASIL, 1997).



**Figura 1.** Perfil eletroforético dos leites pasteurizado (A) e UHT (B). A1R – A4R e A5R – A8R (condições redutoras), A1 - A4 e A5 - A8 (condições não redutoras)

## CONCLUSÕES:

A partir das análises físico-químicas conduzidas observou-se que todas as marcas analisadas atingiram os padrões exigidos por suas respectivas legislações, e dos padrões descritos pela literatura. A análise do perfil proteico dos leites através da técnica de eletroforese SDS-PAGE permitiu a separação das principais frações proteicas do leite e, ao utilizar condições redutoras e não redutoras, foi possível identificar as diferenças entre amostras de leite pasteurizado e UHT associadas à diferença na intensidade dos tratamentos térmicos.

## BIBLIOGRAFIA

AOAC International. **Official methods of analysis of AOAC International**. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076)>. Acesso em 02 de março de 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 370, de 4 de setembro de 1997**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=08/09/1997&jornal=1&pagina=52&totalArquivos=160>>. Acesso em 02 de março de 2023.

FOX, P. F.; T. UNIACKE-LOWE, MCSWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J.A. **Dairy chemistry and biochemistry**. 2th. ed. Springer, 2015, p. 598.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

SHARMA, N.; SHARMA, R.; RAJPUT, Y. S.; MANN, B.; SINGH, R.; GANDHI, K. Separation methods for milk proteins on polyacrylamide gel electrophoresis: Critical analysis and options for better resolution. **International Dairy Journal**, v. 115, p. 104920, 2021.

WALSTRA, P.; WOULTER, J.T.M; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2006. 739 p.