

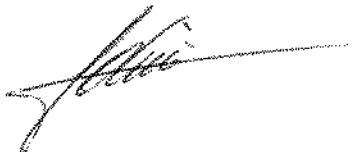
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcial

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Luiz Francisco Prata e aprovada pela comissão julgadora em 24.10.91.



ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO  
ULTRAVIOLETA PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA EM LEITE E DERIVADOS.

LUIZ FRANCISCO PRATA

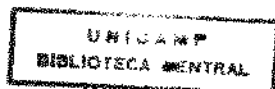
Orientador: Prof. Dr. JOSÉ SÁTIRO DE

OLIVEIRA

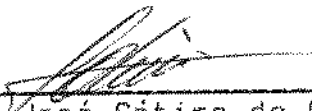
27/91


Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

- 1991 -



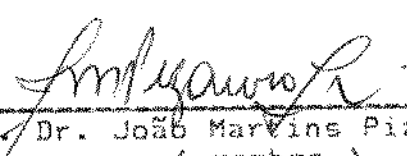
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Satiro de Oliveira  
( orientador )


  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antônio Nader Filho  
( membro )

*Suplente*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arlindo Moreira Sales  
( membro )

*Heloisa M. Cecchi*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Heloisa M. Cecchi  
( membro )

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Marvins Pizauro Júnior  
( membro )

*Suplente*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig  
( membro )

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri  
( membro )

Campinas, 24 de outubro de 1991.

Nenhuma ciência existe que haja saído pronta do cérebro de um homem. Todas, sem exceção, são fruto de observações sucessivas, apoiadas em observações precedentes, de um ponto conhecido para chegar ao desconhecido.

ALLAN KARDEC (1868).

à

ALDA MARIA,

pela paciência e  
incentivo;

e à CAMILA, ao BRUNO, e  
agora também, ao  
ALEXANDRE.

## AGRADECIMENTOS

Em especial ao prof. Dr. JOSÉ SÁTIRO DE OLIVEIRA, pela orientação, amizade e convivência profissional;

À profª Drª ANA MARIA G. MASSABNI, do Instituto de Química de Araraquara-UNESP, pela disponibilidade e atenção na orientação da obtenção dos espectros de absorção;

À profª MARTA A. BARBIERI BELARMIND, que efetuou a revisão do original;

Ao prof. Dr. ARAMIS AUGUSTO PINTO, do Departamento de Microbiologia da FCAVJ-UNESP, que permitiu a utilização de seu laboratório;

À MARIA A. DIAS TOSTES FIGUEIRA, técnica de laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAVJ-UNESP, pela indispensável colaboração na execução das análises;

Aos COLEGAS e FUNCIONÁRIOS do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAVJ-UNESP, que gentil e assiduamente participaram do painel de experimentação de queijos;

As indústrias de laticínios que gentilmente facilitaram o acesso às suas instalações;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - FCAVJ-UNESP, pela permissão de afastamento para frequência em curso de pós-graduação;

À CAPES-Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa que muito contribui para a realização de trabalhos dessa natureza;

À CPE, atual FUNDUNESP, pela concessão de auxílio financeiro para execução do presente trabalho; e

À ABIA pelo auxílio à elaboração dos exemplares da tese.

## ÍNDICE GERAL

ASSUNTO	PÁGINA
RESUMO.....	I
SUMMARY.....	II
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Atividade proteolítica no leite e derivados.....	4
2. Métodos para a determinação da atividade proteolítica no leite e derivados.....	19
3. Espectro de absorção de proteínas, peptídios e amino- ácidos no ultravioleta.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
1. Soluções e reagentes.....	35
2. Diálise.....	36
3. Testes preliminares.....	38
3.1. Espectrofotometria na região ultravioleta.....	38
3.2. Ensaio enzimático.....	39
3.3. Contagens microbiológicas.....	39
4. Estimacão da atividade proteolítica.....	40
4.1. Método de HULL-Equivalentes de Tirosina.....	40
4.2. Método na região Ultravioleta.....	41
5. Amostras.....	41
5.1. Leite cru.....	41

5.1.1.Amostras individuais.....	42
5.1.2.Amostras coletivas.....	42
5.2.Queijos.....	42
5.3.Leite longa-vida (UHT).....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
1.Padronização do método espectrofotométrico.....	45
1.1.Diálise comparativa.....	45
1.2.Padronização do método na região ultravioleta.....	49
1.2.1.Definição espectrofotométrica.....	49
1.2.2.Associação da diálise à determinação espectrofotométrica.....	59
1.2.3.Comparação dos métodos.....	64
2.Aplicação do método desenvolvido.....	72
2.1.Correlação entre qualidade microbiológica do leite cru e atividade proteolítica.....	72
2.2.Estimativa da evolução proteolítica em amostras de queijo tipo "Minas Frescal" durante a esto- cagem refrigerada a 6°C.....	76
2.3.Estimativa da evolução proteolítica em amostras de leite longa-vida (UHT), durante a estocagem em temperatura ambiente.....	85
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92



## ÍNDICE DE FIGURAS E QUADROS

ASSUNTO	PÁGINA
FIG. I. Relação da diálise comparativa de amostras de leite e derivados em membrana de acetato de celulose importada e nacional (envoltório industrial, estimadas pelo método de HULL).....	47
FIG. II. Espectro de absorção de Soro-Albumina Bovina na região ultravioleta (200 a 300 nm).....	50
FIG. III. Espectro de absorção de Caseína Bovina de diferentes procedências na região ultravioleta (200 a 300 nm).....	51
FIG. IV. Efeito da adição da concentração de Caseína sobre a absorção, para alguns comprimentos de onda no Ultravioleta.....	56
FIG. V. Efeito da adição da concentração de Glicil-L-prolina sobre a absorção a 220 nm.....	56
FIG. VI. Comportamento do espectro de absorção de diferentes concentrações de tripeptídio (Valilglicilglicina) em comprimentos de onda entre 210 e 220 nm.....	58
FIG. VII. Curvas de recuperação do dipeptídio Glicil-L-prolina adicionado a amostras de leite em concentrações crescentes, após a diálise.....	60
FIG. VIII. Proteólise enzimática por Tripsina no leite (400 ppm) em função do tempo de diálise, a 220 nm....	62
FIG. IX. Distribuição de trinta (30) amostras de leite recém-ordenhado quanto à atividade proteolítica original.....	66
FIG. X. a. Resultado comparativo da evolução proteolítica no leite, pelos métodos de HULL e Ultravioleta.....	68
FIG. X. b. Evolução proteolítica de amostras individuais de leite cru estocadas assepticamente, determinada pelos métodos de HULL e Ultravioleta.....	68
FIG. XI. Correlação entre o método de HULL e UV-220 nm na estimação da atividade proteolítica de leite e derivados.....	71
FIG. XII. Correlação entre qualidade microbiológica do leite cru (UFC/mL) e atividade proteolítica original (Absorvância - UV-220 nm).....	74
FIG. XIII. Distribuição de cento e quarenta amostras de leite cru quanto à atividade proteolítica original, determinada pelo método UV-220 nm.....	75
FIG. XIV. Evolução proteolítica de cinco amostras de queijo tipo "Minas Frescal", durante estocagem a 6°C (Produção artesanal).....	78
FIG. XV. Evolução proteolítica de cinco amostras de queijo tipo "Minas Frescal", durante estocagem a 6°C (Produção industrial).....	79

FIG.XVI.a.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 6°C. ( Aroma ou cheiro ).....	82
FIG.XVI.b.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 6°C. ( Textura ).....	82
FIG.XVI.c.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 6°C. ( Sabor ou gosto ).....	83
FIG.XVI.d.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 6°C. ( Sabor residual ).....	83
FIG.XVII.Evolução proteolítica de cinco ciclos de leite longa-vida (UHT) determinada pelo método UV-220 nm, a intervalos durante o período de estocagem a temperatura ambiente.....	86
QUADRO I.Comparação de alguns coeficientes de extinção (E1mg/mL) determinados no presente trabalho para algumas soluções protéicas puras, na região do Ultravioleta, com os dados da literatura.....	54
QUADRO II.Resultados comparativos da atividade proteolítica original, de amostras de leite individual recém-ordenhado, estimada pelos métodos de HULL e Ultravioleta.....	65

## RESUMO

A proteólise afeta adversamente a qualidade do leite e de seus sub-produtos, limitando a estocagem e levando à degradação dos seus constituintes, principalmente em leite submetido a tratamento por UHT ( ultra high temperature ). Disso resulta a necessidade de métodos simples e sensíveis para estimar e demonstrar essa atividade proteolítica, que possam ser aplicados ao leite e seus derivados.

A diálise do leite contra água e o espectro de absorção de proteínas e peptídios devido à ligação peptídica na faixa do ultravioleta, constituíram os elementos iniciais para as hipóteses testadas, objetivando o desenvolvimento de um método espectrofotométrico na região dos 200-230 nm para essa finalidade.

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento e a padronização desse método, partindo-se da diálise comparativa de leite e derivados, da definição espectrofotométrica para proteínas e oligopeptídios puros, da associação da diálise à determinação espectrofotométrica e à demonstração de proteólise enzimática "in vitro". O método foi comparado ao de HULL na avaliação da atividade proteolítica original de leite recém-ordenhado (  $r = 0,9962$  ) e à estimativa da proteólise em amostras variadas de leite e derivados (  $r = 0,9296 - t^{**}$  ).

A aplicação do método desenvolvido mostrou a inexistência de correlação significativa entre a qualidade microbiológica original do leite cru e sua atividade proteolítica. Para a estimativa da evolução proteolítica, em queijo tipo "Minas frescal" durante a estocagem refrigerada, correlacionou-se muito bem com o aparecimento e evolução de características indesejáveis possivelmente decorrentes da proteólise. Em leite longa-vida ( UHT ) mostrou-se também adequado, embora nas amostras analisadas a proteólise tenha sido muito discreta.

Os resultados obtidos foram promissores, evidenciando que o método é mais apropriado e de maior sensibilidade que o de HULL para a determinação de proteólise, constituindo-se numa alternativa simples, rápida e barata.

## SUMMARY

It's well known that proteolysis affects adversely the milk quality and of their by-products, limiting the shelflife and leading to a degradation of their constituents, mainly in milk submitted to ultra-high temperature treatment, like UHT-milk. It's well known too, the need for simple and sensitive methods to estimate and demonstrate this proteolytic activity, applied to milk and milk products.

The dialysis of milk against water and the absorption spectra of proteins and peptides due to the peptide bonds in the ultraviolet range were the start-points for the hypothesis to be tested in this research.

This research describes the development and standartization of a spectrophotometric method in the UV-range (200-230 nm) with the aim to supply a want. It was compared to the HULL method ( $r = 0,9296 - t^{**}$ ) and applied to quantitation and monitoring proteolysis in raw milk, UHT-milk and "Minas Frescal" cheese, a Brazilian kind of cheese with high moisture and not submitted to ageing.

The results was very promising, showing higher sensitivity and being more suitable than the Hull method to detect proteolysis. Still showed that the method is very simple, rapid and unexpensive.

## INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos naturais mais importantes. Embora intensivamente estudado sob os mais variados aspectos, muitos ainda permanecem incógnitos, principalmente devido à sua complexa composição. Ao longo do tempo, o aspecto durabilidade tem sido um dos objetivos mais perseguidos, procurando-se obter estabilidade durante a estocagem. Todavia, na atualidade, apenas dois métodos permitem prolongamento de sua durabilidade em condições de temperatura ambiente: a desidratação ( redução do teor de água para valores próximos de 4% -  $A_w < 0,6$  ) e a esterilização ( UHT-Ultra High Temperature Treatment ).

Mesmo tratado pelo sistema UHT, o leite sofre alterações importantes durante a estocagem as quais determinam sua limitação. A causa principal dessas alterações tem sido atribuída à ação de lipases e proteases, ambas próprias do leite ou de origem bacteriana, que sobrevivem ao tratamento térmico e permanecem ativas.

A atividade proteolítica tem sido responsabilizada pelo encurtamento do período de estocagem por estar intimamente associada à desestabilização do produto. Promove rarefação ou aumento da transparência (agethinning), gelificação e coagulação (agethickening), aparecimento de sabor amargo e aumento gradual do nitrogênio não protéico (NNP).

Consequente da evolução dos sistemas de produção e obtenção do leite, das facilidades de aquisição e aplicação de novas tecnologias e da importância de certos fatores sócio-econômicos, tem aumentado a prática da estocagem refrigerada do leite cru, a nível de produção, por períodos de tempo relativamente longos. Isso tem favorecido a seleção e o desenvolvimento de bactérias psicrotóxicas. Dentre essas, as do gênero Pseudomonas têm merecido grande atenção, principalmente por sua capacidade de produzir proteases extracelulares que demonstram extrema resistência aos tratamentos térmicos convencionais de laticínios.

Nesses casos, aliada à ação das proteases nativas, determinam potencialização da ação deteriorativa, fato que tem gerado enorme interesse por pesquisas nessa área, bem como expectativa dos pesquisadores diante da urgente necessidade de métodos simples e sensíveis que possam avaliar e demonstrar a atividade proteolítica no leite.

Os métodos mais rápidos e promissores com tal objetivo, até o presente, baseiam-se na análise de amostras de leite a partir das variações da fração solúvel em TCA (Ácido Tricloroacético), fato que resulta em inconvenientes e limitações.

A aplicação da diálise para separação e recuperação dos produtos da proteólise, em substituição à precipitação com TCA, e sua posterior análise quanto à atividade proteolítica, permitiu vislumbrar outras possibilidades utilizando o mesmo princípio básico. Do mesmo modo, trabalhos sobre a determinação quantitativa e comportamento do espectro de absorção de proteínas e aminoácidos na região do ultravioleta (comprimentos de onda

menores que 250 nm ), possibilitou a elaboração de hipóteses sobre a associação do princípio da diálise e do comportamento de proteínas e suas frações ( oligopeptídeos ) nessa região do espectro. Dessas premissas advém o objetivo deste trabalho, que é padronizar e aplicar, comparativamente, um método espectrofotométrico na região dos 200-230 nm, com a finalidade de determinar, de forma simples, rápida e sensível, a atividade proteolítica em amostras de leite destinadas aos mais variados propósitos tecnológicos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NO LEITE E DERIVADOS.

Nas últimas décadas, a evolução tecnológica no setor de laticínios tem sido intensa. O aspecto econômico tem norteado uma crescente centralização das operações, determinando a necessidade de prolongamento do tempo de estocagem do leite cru. Essa condição de estocagem tem sido possível através do emprego generalizado de refrigeração a nível de fazendas de produção, transporte e industrialização. Em países desenvolvidos, embora a manutenção do leite em temperatura de refrigeração tenha praticamente eliminado a deterioração decorrente do desenvolvimento de bactérias mesófilas (FAIRBAIN & LAW, 1986), essa prática tem gerado novos problemas, principalmente a seleção de organismos psicrotróficos (LAW, 1979). De interesse na área de laticínios (THOMAS, 1974) e segundo EDDY (1960), esses organismos são definidos como bactérias capazes de se desenvolver em temperatura igual ou inferior a 7°C, independentemente de sua temperatura ótima de desenvolvimento.



A flora psicrotrófica normalmente encontrada no leite é constituída basicamente de bastonetes Gram-negativos termo-sensíveis (THOMAS, 1974), todavia, algumas espécies Gram-positivas termo-resistentes têm sido isoladas (SHEHATA & COLLINS, 1971; WASHAM et al., 1977). As espécies termo-resistentes podem ser responsabilizadas por algumas alterações deteriorativas no leite e derivados estocados após o tratamento térmico. Entretanto, essas alterações são decorrentes do próprio desenvolvimento bacteriano, não havendo o envolvimento independente de nenhuma enzima específica.

Por outro lado, embora a pasteurização ou outro tratamento térmico (UHT) seja capaz de eliminar a totalidade dos psicrotróficos remanescentes (Gram-negativos termo-sensíveis), é bem conhecido que muitas de suas espécies são produtoras de enzimas extracelulares termo-resistentes, capazes de degradar importantes constituintes do leite (LAW, 1979; DIERMAYR et al., 1987; McKELLAR, 1982; SHAMSUZZMAN & McKELLAR, 1987; STEAD, 1987-a e BUCKY et al., 1988).

Tem-se verificado que esses organismos, embora presentes no leite recém-ordenhado em número inicialmente insignificante (geralmente < 10% da flora total), podem tornar-se completamente dominantes após algum tempo de estocagem sob refrigeração (GEHRIGER, 1980; FAIRBAIN & LAW, 1986), sendo a maioria pertencente ao gênero Pseudomonas (THOMAS, 1974). São organismos que permanecem em grande atividade durante a estocagem refrigerada, com intensa produção de enzimas extracelulares responsabilizadas por alterações significativas nos constituintes do leite, que determinam redução de sua qualidade e vida de prateleira, extensiva a seus derivados (LAW, 1979). Esses fatos

têm levado vários autores, entre eles RICHTER (1981) e MOL & VICENTIE (1981), citados por FAIRBAIRN & LAW (1986), a considerarem os psicrotróficos, na atualidade, o grupo de microrganismos de maior potencial deteriorativo na indústria de laticínios.

Dentre as enzimas extracelulares, as proteases constituem um grupo de grande importância econômica e tecnológica. Têm a capacidade de atuar diretamente sobre a micela de caseína (LAW, 1979) e, em função de sua termo-resistência, permanecem ativas após os tratamentos térmicos convencionais, tornando-se particularmente importantes em leite e derivados submetidos ao tratamento por "ultra-high temperature"-UHT (ADAMS et al., 1975; GEBRE-EGZIABBER et al., 1980 e McKELLAR, 1982).

Embora a equipe de BABCOCK & RUSSEL, em 1897, já sugerisse a existência de atividade proteolítica no leite e THATCHER & DAHLBERG, em 1917, a confirmassem (WEBB et al., 1978; HUMBERT & ALAIS, 1979), somente após a difusão da estocagem refrigerada (JUFFS, 1973) e, mais recentemente, com o incremento da utilização do processo "UHT" e similares, é que tem havido uma maior preocupação em estudos relacionados, demonstrada pela grande quantidade de trabalhos publicados na atualidade. Nesses trabalhos, é evidente a existência de dois grupos distintos de pesquisadores: um trabalhando com as proteases naturais do leite, também denominadas de "nativas" e outro trabalhando com as proteases de psicrotróficos. Apesar do pouco inter-relacionamento das áreas abrangidas, uma complementação pode ser observada.

Das proteases nativas, também de alta estabilidade térmica, a principal é a protease alcalina, que nada mais é do que a enzima plasmina do sangue ou suas formas precursoras

(zimogênio-plasminogênio)(deRHAM & ANDREWS, 1982; ANDREWS, 1983; ANDREWS & ALICHANIDIS, 1983; PÉLISSIER, 1984 e GRUFFERTY & FOX, 1988).

As proteínas do soro são relativamente resistentes à ação dessas proteases (CHEN & LEDFORD, 1971; FOX & HEARNE, 1978; PEARCE, 1989), entretanto, as frações de caseína são muito susceptíveis. Estabelecidas algumas de suas propriedades bioquímicas, WEINSTEIN & DOOLITTLE (1972), citados por ANDREWS (1983), definiram que a protease alcalina rompe as cadeias polipeptídicas após os resíduos de arginina ou lisina, com preferência para as ligações de lisina. Dessa ação, resulta a hidrólise rápida da beta-caseína, dando origem, inicialmente, às frações conhecidas como gama-caseínas e dois componentes da fração proteose-peptona: PP-5 e PP-8F (ANDREWS, 1979; GORDON & GROVES, 1975). De acordo com ANDREWS & ALICHANIDIS (1983), o componente PP-5 representa uma mistura dos resíduos N-terminais 1-105 e 1-107 da beta-caseína. O componente PP-8F é o fosfopeptídeo N-terminal correspondente aos resíduos 1-28, enquanto que as porções 29-209, 106-209 e 108-209, correspondem, respectivamente, às frações anteriormente denominadas gama-1, gama-2 e gama-3 caseínas (EIGEL et al., 1984). Ainda, segundo esse mesmo autor, o fragmento remanescente da beta-caseína após essa hidrólise (resíduos 29-105 e 29-107) corresponderia à fração proteose-peptona conhecida como componente "8-slow" (PP-8S) que, entretanto, não tem a concordância de ANDREWS & ALICHANIDIS (1983).

Depois da beta-caseína, a fração alfa-S é a mais atingida. A alfa-S<sub>2</sub>-caseína é rapidamente hidrolisada enquanto a alfa-S<sub>1</sub> sofre um ataque muito mais lento (EIGEL, 1977; ANDREWS,

1983). A fração kapa-caseína tem se mostrado a mais resistente à ação da protease alcalina (CHEN & LEDFORD, 1971; EIGEL, 1977). Contrariamente à fração beta-caseína, os fragmentos produzidos a partir dessas frações protéicas não foram ainda identificados (ANDREWS, 1983).

GRIEVE & KITCHEN (1985) procuraram verificar, comparativamente, a ação proteolítica de origens diferentes sobre as proteínas do leite. É interessante verificar que, aliado a um significado prático diferenciado com respeito ao potencial hidrolítico, esses autores sugeriram que a velocidade ou taxa de hidrólise das caseínas seja:  $\alpha\text{-S}_1 > \beta >> \text{kapa-caseína}$  para os extratos leucocitários;  $\beta > \alpha\text{-S}_1 >>> \text{kapa-caseína}$  para a plasmina bovina, e  $\beta = \text{kapa} > \alpha\text{-S}_1$  caseína para protease de Serratia marcescens.

Para origem microbiana, há uma concordância de que a maioria das proteases de psicotróficos atuam preferencialmente sobre a fração kapa-caseína seguida da beta, hidrolisada mais rapidamente que a alfa-caseína (ADAMS et al., 1976; LAW et al., 1977; 1979; GEBRE-EGZIABER et al., 1980; STEPANIAK et al., 1982; GRIEVE & KITCHEN, 1985). Embora muito menos estudadas, tem-se demonstrado que as proteínas do soro são relativamente insensíveis à ação das proteases de psicotróficos (FAIRBAIRN & LAW, 1986).

Essa atividade proteolítica tem sido intensivamente estudada sob vários aspectos. Entretanto, diferentemente do que ocorre com as proteases nativas, os produtos dessas hidrólises ainda não estão identificados. Como essas proteases atacam de pronto e principalmente a kapa-caseína, há uma desestabilização da micela que leva à coagulação do leite, de modo semelhante ao

que ocorre na coagulação enzimática. O produto da hidrólise da beta e alfa-caseínas contribuiria com a acumulação de peptídios amargos (FAIRBAIRN & LAW, 1986). Conseqüentemente, vários autores consideram a proteólise decorrente de organismos psicrotróficos a responsável pelos fenômenos de "gelação", mesmo coagulação, e desenvolvimento de odor-sabor sujo e amargo (MAYERHOFER et al., 1973; ADAMS et al., 1975; 1976; LAW et al., 1977; SENIK et al., 1982; CHRISTEN et al., 1986; MANJI et al., 1986 e VENKESH et al., 1989).

A esse respeito, vários experimentos demonstram o envolvimento de proteases de espécies psicrotróficas persistindo, entretanto, divergências quanto à quantidade de organismos e/ou sua atividade proteolítica para produzir tais alterações.

COUSIN (1982) procurou sintetizar os dados disponíveis objetivando estabelecer aproximadamente o número de organismos psicrotróficos necessários para promover alterações de sabor; entretanto, constatou uma variação muito ampla que pode ser justificada por diferentes termo-estabilidade e atividade proteolítica das enzimas envolvidas, até dentro de uma mesma espécie.

LAW et al. (1977) demonstraram a necessidade de que a cepa NCDO 2085 de Pseudomonas fluorescens se desenvolvesse até  $5 \times 10^7$  para evidenciar o fenômeno da "gelação" entre 10 a 14 dias após o tratamento por "UHT" ( $140 \pm C/3,5''$ ) e estocagem a  $20 \pm C$ . Essa mesma cepa, com desenvolvimento de  $8 \times 10^6$  c.f.u./ml (unidades formadoras de colônias), necessitou de 8 a 10 semanas para evidenciar o mesmo fenômeno nas mesmas condições. ADAMS et al. (1976), trabalhando com dez culturas diferentes de psicrotróficos isoladas de leite cru e identificadas como

pertencentes ao gênero Pseudomonas, verificaram não ser necessário grande aumento na população desses organismos para que alterações fossem detectadas. Assim, para uma das culturas com desenvolvimento de apenas  $10^4$ /mL, em 2 dias a  $5^\circ\text{C}$ , foi possível verificar um decréscimo estimado entre 10 e 20% da fração kapa-caseína. Todavia, FAIRBAIRN & LAW (1986) afirmam que esses resultados precisam ainda ser confirmados por outros autores.

Os dados de DRIESSEN (1976), citados por FAIRBAIRN & LAW (1986), mostram que a ocorrência de sabor amargo e textura gelatinosa foi observada sete semanas após tratamento por "UHT" e estocagem a  $20^\circ\text{C}$ , quando um leite cru inoculado com uma cultura de Ps. fluorescens 22-F apresentou a contagem de  $5 \times 10^5$  c.f.u./mL.

No mesmo experimento de LAW et al. (1977), foi verificado que o leite com baixa contagem inicial e outro contendo  $8 \times 10^5$  c.f.u./mL de psicrotóxicos do gênero Pseudomonas não apresentaram alterações significativas por pelo menos 20 semanas após a esterilização embora, nesse último, tenha sido observada a formação gradual de um sedimento.

COUSINS et al. (1977) demonstraram que a flora psicrotóxica normalmente encontrada no leite cru pode, em três dias ou pouco mais, atingir a cifra de  $10^7$  c.f.u./mL quando o leite é estocado em temperatura variando entre 4 e  $10^\circ\text{C}$  antes do processamento.

O trabalho de COUSIN & MARTH (1977) mostra que leite UHT contendo flora normal e outro com uma espécie de Pseudomonas, tornaram-se instáveis quando a população bacteriana ultrapassou, respectivamente, as cifras de  $7 \times 10^6$  e  $4 \times 10^7$  c.f.u./mL.

Vários autores reportam o envolvimento de proteases de psicrotróficos, demonstrando sempre sua associação com o desenvolvimento de odores-sabores anormais e instabilidade do leite ao processamento por "UHT" (McKELLAR, 1981; TORRIE et al., 1983; JANZEN et al., 1982). Esse último definiu, ainda, uma relação direta entre o odor/sabor do leite pasteurizado com a contagem de organismos psicrotróficos do leite cru. Nesse aspecto, MOTTAR (1981), demonstra que a contagem de psicrotróficos proteolíticos se correlaciona com a atividade residual proteolítica após o tratamento por "UHT", mas essa mesma correlação não ocorre com a contagem total do leite cru.

De modo geral, LAW (1979) e FAIRBAIRN & LAW (1986) situam conclusivamente a necessidade de uma população de psicrotróficos da ordem de  $5 \times 10^6$  c.f.u./mL para a ocorrência de alterações organolépticas. A contagem de  $5 \times 10^6$  c.f.u./mL é também a cifra referida como de rejeição antes do processamento por MUIR & PHILLIPS (1984), citados por FAIRBAIRN & LAW (1986). Esses mesmos autores, na descrição de um método visando ao pré-estabelecimento da vida de prateleira, baseado na velocidade de multiplicação a uma dada temperatura, exemplificam que, numa estocagem a 4°C/72h, a contagem inicial do leite não pode ultrapassar a  $2 \times 10^3$  c.f.u./mL.

No final da revisão apresentada por FAIRBAIRN & LAW (1986), concluem que as proteases de psicrotróficos podem não se constituir em problema desde que o leite cru seja obtido com muito boa assepsia e mantendo-se a contagem bacteriana baixa, isto é, com estocagem a 4°C ou menos. Nesse aspecto, os dados de GEHRIGER (1980) mostram a possibilidade da estocagem do leite cru de ótima qualidade inicial por até 7 dias, em temperatura

oscilando entre 1,5 e 2°C, obtendo-se, no final do período, contagem inferior a  $1,5 \times 10^4$ /mL. Entretanto, segundo REIMERDES (1982), citado por FAIRBAIRN & LAW (1986), a estocagem do leite em temperaturas muito baixas, como no caso citado, leva a uma dissociação das caseínas e pode afetar as propriedades do leite frente ao processamento.

McKELLAR (1981) mostra que o leite esterilizado por processo de "UHT" parece ter o dobro da sensibilidade a proteases de Ps. fluorescens quando comparado ao leite cru. ADAMS et al, (1976) afirmam que o tratamento de leite normal por "UHT" promove desnaturação de alfa-lactalbumina e beta-lactoglobulina, entretanto, nenhum efeito é verificado na fração caseína. Assim, como a micela apresenta elevada termo-estabilidade, a diferença na susceptibilidade à proteólise entre leite cru e processado por "UHT", não seria devida a diferenças na integridade da micela e sim, à existência de inibidores naturais de proteases encontrados no leite cru (REIMERDES, 1982), demonstrados termolábeis.

Para RENNER (1988), os resultados de GUTHY et al., (1985) provam quantitativamente a hipótese de causa enzimática para a geleificação de leite submetido a processo de "UHT". Medindo o volume de agregação de partículas durante a estocagem, esse autor concluiu que, em função do desenvolvimento exponencial das partículas, imediatamente antes da agregação e após um distinto período de "lag-phase", observado em todas as amostras analisadas, estava evidente a ação de uma ou mais enzimas que sobreviveram ao tratamento por "UHT". Com origem não enzimática, os resultados expressariam uma cinética totalmente diferente, possivelmente de crescimento linear.



## 2. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NO LEITE E DERIVADOS.

A ação de enzimas proteolíticas sobre as frações protéicas do leite promovem o aparecimento gradual de proteoses-peptonas, peptídios e aminoácidos, proporcional à atividade enzimática (REITER et al., 1969; ALAIS, 1975). Essa atividade leva a um aumento, tanto da fração nitrogenada não-caseína (NNC), solúvel a pH 4,6, como também da fração nitrogenada não protéica (NNP), solúvel em ácido tricloroacético. Essas modificações são representativas da atividade proteolítica no leite e derivados porque o substrato natural se acha envolvido (MOTTAR & DRIESSEN, 1987).

É fato consumado que as enzimas proteolíticas afetam adversamente as propriedades do leite frente ao processamento tecnológico, depreciando sua qualidade e a de seus derivados. Conseqüentemente, há uma necessidade unânime e urgente de métodos rápidos, sensíveis e seguros para a determinação dessa atividade, em atendimento aos mais variados propósitos (LAW, 1979; RICHTER et al., 1979; MISTRY & KOSIKOWSKI, 1983; KWAN et al., 1983 e MOTTAR & DRIESSEN, 1987).

Um dos métodos de maior aceitação e mais frequentemente utilizado para a estimativa da proteólise em leite e derivados, baseia-se na determinação dos aminoácidos aromáticos liberados, quer seja pela medida da absorção a 280 nm (HULL, 1947) quer pelo

desenvolvimento de reação e determinação colorimétrica segundo o princípio de Folin-Ciocalteu (HULL, 1947; LOWRY et al., 1951). LOWRY e colaboradores combinaram o uso do cobre com o método previamente desenvolvido utilizando o reagente de Folin-fenol. Aparentemente, o cobre liga-se à estrutura peptídica e facilita a transferência de elétron para o cromógeno ácido, principalmente nas proximidades dos grupos funcionais dos aminoácidos, aumentando a sensibilidade. Os principais aminoácidos cromogênicos são tirosina e triptofano e, em menor escala, cistina, cisteína e histidina. Embora a cor para a mistura de aminoácidos livres seja aditiva, no caso de peptídios pode ser maior ou menor que a soma dos componentes, dependendo da sequência, comprimento da cadeia e da exposição dos grupos funcionais. Muitas substâncias exercem interferências na determinação de proteínas pelo método de LOWRY e nas suas modificações. A literatura científica tem-lhe denotado considerável atenção pois, apesar da simplicidade e sensibilidade, apresenta desvantagens, principalmente quanto à falta de especificidade, à velocidade de reação um tanto lenta e à não linearidade da curva-padrão. A completa hidrólise de uma proteína reduz sua cromogenicidade pela metade a dois terços. Desde que há um grande número de sequências cromogênicas nas proteínas, a cromogenicidade de diferentes proteínas não pode ser predita com base na sua estrutura, nem sua estrutura predita com base na cromogenicidade (PETERSON, 1979).

Apesar de utilizar o substrato natural, a própria caseína, e de ser um dos mais frequentemente empregados, segundo REIMERDES & KLOSTERMEYER (1976) e MOTTAR & DRIESSEN (1987), a resposta, em termos de equivalentes de tirosina (TE), é de pouca

sensibilidade em virtude da pequena quantidade, e mesmo inexistência, de aminoácidos aromáticos nos produtos de proteólise da caseína.

Doutros métodos colorimétricos usando substratos específicos têm sido muito estudados, sendo que as mudanças de intensidade de cor são diretamente proporcionais à extensão da proteólise e, portanto, da atividade das proteases. Como substratos testados têm-se: a azocaseína, os derivados de nitroanilina, a hemoglobina e o "hide-powder azure" (pele ou colágeno em pó azul-celeste). Segundo MOTTAR & DRIESSEN (1987), a sensibilidade de tais métodos depende principalmente da natureza e estrutura do substrato e, embora sejam razoavelmente rápidos, não refletem, necessariamente, a atividade enzimática sobre as proteínas do leite.

O método que utiliza o "hide-powder azure" foi descrito por CLIFFE & LAW (1982). Baseia-se na liberação de peptídeos azuis solúveis, pela proteólise de um substrato artificial que, no caso, consistiu de colágeno ligado ao corante. O aumento da absorvância resultante, medida numa solução tamponada simples a 595 nm, é então utilizado como um índice da atividade proteolítica. Segundo STEAD (1987-b), embora seja um procedimento simples e sensível, com vantagens sobre a digestão da azocaseína utilizada por KROLL & KLOSTERMEYER (1984), ou sobre a digestão da caseína seguida da determinação de grupamentos  $\text{NH}_2$  liberados pela sua reação com o ácido trinitrobenzeno-sulfônico (TNBS), a utilização do método para análises quantitativas envolve procedimentos trabalhosos e demorados, desde a recuperação dos peptídeos, emulsificação com várias centrifugações e, ainda, perdas por sedimentação junto com a caseína.

SCHWABE (1973) descreveu um método baseado na reação de amino-grupos primários, liberados durante a proteólise e recuperados pela precipitação com TCA, com uma substância fluorescente, a "fluorescamine" ( fluorescamina ). Modificado por CHISM et al.(1979), o método mostrou-se sensível para a determinação da atividade proteolítica, e relativamente livre de interferências. Posteriormente, o método foi novamente modificado por CASTELL et al.(1979), objetivando melhorar sua sensibilidade.

Outros métodos fluorimétricos têm sido descritos e avaliados: o de PIERZCHALA et al.(1979) medindo a concentração de produtos fluorescentes liberados de um tripeptídeo sintético não fluorescente, o de KINOSHITA et al.(1980) empregando substratos protéicos ligados a isotiocianato; o de KHALFAN et al.(1983) utilizando um substrato macromolecular fluorogênico, o 4-metilumberiferil-caseína; etc... Embora apresentem boa sensibilidade, tais métodos parecem também ser muito sensíveis a interferências de constituintes do leite e de agentes clarificantes contendo detergentes, além do fato das substâncias fluorescentes empregadas serem muito caras (LAW & ANDREWS, 1984; MOTTAR & DRIESSEN, 1987).

Embora os métodos eletroforéticos, normalmente conduzidos em acetato de celulose ou em géis de amido (SGE) ou poliacrilamida (PAGE), sejam também utilizados, prestam-se muito mais a estudos detalhados de identificação de fragmentos em avaliações comparativas das mudanças dos padrões. Para uso rotineiro, são caros, trabalhosos e muito demorados; não havendo a necessária precisão quanto a aspectos quantitativos das determinações ( MOTTAR & DRIESSEN, 1987).

Um método relativamente simples é o da difusão radial em gel de agar. Um meio de cultura contendo caseína é inoculado com amostras supostamente proteolíticas, incubado por um período de tempo, e observa-se, então, o aparecimento de zonas claras, pela degradação da caseína, ou mesmo zonas de precipitação. De acordo com MOTTAR & DRIESSEN (1987), além de requererem longa incubação, não apresentam a necessária precisão. Por outro lado, os métodos empregando substâncias radioativas, como o de EXTERKATE (1975) que usa caseína metilada- $[^{14}\text{CH}_3]$  e hemoglobina, e o de HOFMAN et al. (1979) utilizando beta-caseína ligada a  $\text{I}^{125}$ , apresentam limitações técnicas. Procedimentos baseados na técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que utilizam conjugados da fosfatase alcalina e são conduzidos em microplacas, foram tentados por BIERKELAND et al. (1985). Entretanto, o método avalia a atividade antigênica presente e não a atividade enzimática, não havendo, necessariamente, uma relação entre elas. Adaptações e modificações da técnica de ELISA têm proporcionado intensa divulgação e utilização para outras finalidades analíticas, constituindo-se num sistema modelo promissor, necessitando, todavia, de maiores estudos (MOTTAR & DRIESSEN, 1987).

As modificações das frações nitrogenadas não protéicas, como o NNC-nitrogênio não-caseína e NNP-nitrogênio não protéico, que apresentam aumento gradual como consequência da atividade proteolítica sobre as proteínas do leite, foram também muito utilizadas por vários pesquisadores (GED & ALAIS, 1975; KISHONTI, 1975; NOOMEN, 1975; DRIESSEN, 1976; CORRADINI & PANINI-PECIS, 1979; MOTTAR, 1979, 1981 e 1983; DRIESSEN, 1981, 1983; TAYFOUR et al., 1982). Embora essas modificações sejam

extremamente representativas da atividade proteolítica sobre o leite e derivados, para que haja a necessária sensibilidade, os métodos exigem longa incubação, além do fato das análises conduzidas pelo método de Kjeldhal serem muito incômodas e trabalhosas para utilização rotineira (MOTTAR & DRIESSEN, 1987). Todavia, essas modificações do substrato natural induzidas pela atividade enzimática parecem indicar o caminho mais promissor. Utilizando essas frações, após a precipitação das demais proteínas do leite com TCA e separação por centrifugação e/ou filtração dos aminoácidos e peptídios que permanecem em solução, vários outros métodos espectrofotométricos têm sido desenvolvidos, sempre objetivando eliminar as desvantagens constatadas (BRADFORD, 1976; SPECTOR, 1978).

Utilizando reagentes específicos de aminoácidos e peptídios como ninidrina, o-ftaldialdeído, ácido trinitrobenzeno-sulfônico (TNBS) e beta-mercaptoetanol, são desenvolvidas reações com formação de compostos coloridos que podem ser avaliados, quanto à intensidade, em comprimentos de onda específicos da região visível do espectro. CHURCH et al. (1983) fizeram uso de o-ftaldialdeído e beta-mercaptoetanol que, complexados a alfa-aminogrupos de aminoácidos e peptídios liberados, indicavam a atividade proteolítica pela intensa absorvidade a 340 nm.

Com essa mesma reatividade dos alfa-aminogrupos, e empregando a caseína como substrato, KUNITZ (1974) desenvolveu um método no qual fez uso do TNBS. Esse método foi usado por JOST et al. (1976); NOREAU & DRAPEAU (1979); McKELLAR (1982 e 1984); LIN et al. (1969); STEPHANIAK et al. (1982) e POLYCHRONIADOÚ (1988). (MOTTAR & DRIESSEN, 1987).

REIMERDES & KLOSTERMEYER sempre se constituíram nos maiores críticos de métodos que utilizam a determinação de aminoácidos aromáticos com finalidade de avaliar a atividade proteolítica. Justificam que os maiores componentes da caseína inicialmente sofrem uma ação limitada das enzimas, resultando em fragmentos apenas parcialmente solúveis em TCA, além do fato de nem todos esses produtos conterem aminoácidos aromáticos. As proteases ácidas hidrolisam as ligações peptídicas da Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> na kapa-caseína e Phe<sup>23</sup>-Phe<sup>24</sup> na alfa-caseína, enquanto a beta-caseína é degradada muito lentamente e de maneira não específica. Desde que somente o fragmento 106-169 resultante da kapa-caseína é solúvel em TCA, apenas ele pode ser avaliado. Menos favorável ainda é a situação com enzimas do tipo da plasmina e tripsina. Neste caso, somente a beta-caseína é substrato favorável. As enzimas proteolíticas específicas do leite, que agem durante a estocagem, atuam da mesma maneira, produzindo quantidades variáveis de gama-caseínas correspondentes ao segmento 29-209 da beta-caseína. O fragmento 1-28 não contém nenhum aminoácido aromático; portanto, dependendo do método utilizado, nenhuma reação proteolítica será registrada. Assim, esses autores, em 1976, descreveram um método utilizando a reação da ninidrina para a determinação da atividade proteolítica no leite.

Seguindo a maneira clássica, obtém-se o filtrado claro da amostra após a precipitação com TCA e centrifugação. A 1 mL do filtrado misturam-se 1 mL da solução de ninidrina e 1 mL de tampão acetato. A mistura é aquecida em banho-maria a 100°C/10 minutos em tubos fechados, resfria-se no ambiente, medindo-se a intensidade da cor desenvolvida a 570-580 nm. Esse procedimento

baseia-se no método clássico descrito por MOORE & STEIN (1948) e modificado pelos mesmos autores em 1954 e por MOORE (1968), o qual utiliza a reação da ninidrina com os grupamento alfa-NH<sub>2</sub>, promovendo aparecimento de uma reação colorida, não só com os aminoácidos, mas também com peptídios, proteínas e outras classes de substâncias que possuem grupos amino livres.

KWAN et al.(1983) compararam quatro métodos para a determinação da atividade proteolítica no leite: a absorvância a 280 nm, o método de LOWRY, o método da "fluorescamine" e o método do TNBS. Todos foram aplicados à fração solúvel obtida pela precipitação com TCA, concluindo que o método da "fluorescamine" foi o mais sensível e fidedigno.

SAMPLES et al.(1984) compararam a atividade proteolítica em queijo "Cheddar" pelo método de HULL e TNBS, mostrando que significante proteólise pode ocorrer sem que seja detectada por métodos que avaliam a liberação de aminoácidos aromáticos, concluindo pela supremacia do método do TNBS.

McKELLAR (1984) comparou o "hide-powder azure" com o método do TNBS na determinação da proteólise em leite desnatado, cujos resultados evidenciaram elevada correlação, indicando que os métodos não diferem significativamente a  $P < 0,05$ .

Recentemente, MITCHELL et al.(1989) utilizaram a azocaseína para a quantificação da proteólise bacteriana no leite, definindo a unidade de atividade como a quantidade de enzima capaz de produzir aumento de 0,01 unidade de absorvância/hora a 366 nm e 37°C. Nesse estudo, os autores verificaram que as proteases secretadas durante o desenvolvimento bacteriano em leite estocado sob refrigeração, produziram odor e sabor amargo que apareceram consideravelmente antes que esses



mesmos efeitos pudessem ser notados com o uso de enzimas purificadas; chamando a atenção para os cuidados que precisam ser tomados na predição da vida de prateleira do leite, com base na densidade de células bacterianas.

IGARASHI (1989) descreveu um método para determinação de gama-caseína baseado na separação quantitativa da fração solúvel aplicada a uma pequena coluna de DEAE-celulose, com posterior eluição e determinação da absorvância a 280 nm; sugerindo sua utilização para a investigação da proteólise em leite bovino.

O trabalho de MISTRY & KOSIKOWSKI (1983) trouxe uma contribuição importante para a determinação da atividade proteolítica no leite, quando propôs a substituição da obtenção do filtrado em TCA pela aplicação da diálise. O emprego de sacos de diálise, como uma câmara de reação, simultaneamente para a separação e estimativa dos produtos finais de atividade enzimática e microbiana, já havia sido demonstrado por BELOFF & ANFINSEN (1948), HERMIER (1965) e HESTRIN et al. (1943). Posteriormente, VINET & FREDETTE (1951) e NURMIKKO (1957) desenvolveram e aplicaram técnicas mais sofisticadas para a cultura de microrganismos em sacos de diálise, medindo os produtos metabólicos dialisados. KOSIKOWSKI (1964) descreveu uma técnica para a determinação da atividade da fosfatase alcalina no leite utilizando também a diálise. As maiores vantagens citadas por MISTRY & KOSIKOWSKI (1983), obtidas com o emprego da diálise foram a simplificação do procedimento, a não formação de turbidez ou presença de compostos interferentes e uma menor necessidade de reagentes, vidraria, papéis de filtro e tempo, adotando-se o procedimento de HULL para a avaliação da proteólise.

Recentemente, ao final de uma revisão dos métodos existentes para a determinação da atividade proteolítica em leite e derivados, MOTTAR & DRIESSEN (1987) emitiram uma opinião conclusiva que convém repeti-la. Nela afirmam que: "Infelizmente não há métodos comumente aceitos e padronizados disponíveis para a avaliação da atividade proteolítica; conseqüentemente, os dados da literatura não são comparáveis. Até que tais métodos sejam desenvolvidos, padrões para níveis permissíveis de atividade enzimática, seja no leite para processamento ou para estimativas de qualidade entre leite cru e produto final, não podem ser estabelecidos. Este é o objetivo do grupo F-15 ( Heat-resistant proteinases in milk ) da IDF ( International Dairy Federation ): propor um método padrão para a avaliação da atividade proteolítica no leite e derivados. Tal método tem que ser rápido e sensível, necessitando ainda ser razoavelmente simples e econômico."

### 3. ESPECTRO DE ABSORÇÃO DE PROTEÍNAS, PEPTÍDIOS E AMINOÁCIDOS NO ULTRAVIOLETA.

A determinação quantitativa da concentração de proteínas por espectrofotometria tem sido utilizada desde 1940 (La BORDE et al., 1979). Dadas as limitações naturais do desenvolvimento tecnológico e industrial, popularizou-se, no meio científico, com grande difusão e aplicação, o método da medida da absorção da luz transmitida a 280 nm (posição aproximada de um máximo de absorção para proteínas de uma longa faixa espectral, que vai de um máximo a 290 nm a um mínimo na região dos 250 nm), tendo sido empregado largamente em análises bioquímicas (GOLDFARB et al., 1951; WADDELL & HILL, 1956; La BORDE et al., 1979). A absorção, nessa região, é causada pela presença de aminoácidos aromáticos na cadeia protéica, principalmente fenilalanina, triptofano e tirosina e, em menor escala, pelo aminoácido cistina, que contém enxofre. A intensidade da absorção nesse comprimento de onda depende da proporção desses aminoácidos na proteína, podendo variar amplamente (WADDELL & HILL, 1956; GOLDFARB et al., 1951; IWADA et al., 1967; SCOPES, 1974 e La BORDE et al., 1979).

As semelhanças qualitativas nos espectros de absorção de fenilalanina, tirosina e triptofano são muito grandes. A comprimentos de onda superiores a 200 nm, todos os três aminoácidos apresentam espectro composto de duas maiores bandas de absorção, uma forte a 210-220 nm e outra fraca a 260-280 nm. A

separação dessas duas bandas de absorção é aproximadamente a mesma para os três cromóforos aromáticos; entretanto, quantitativamente existem notáveis diferenças, particularmente na região da banda menor ( WETLAUFER, 1962).

Houve maior difusão e aceitação do método após a descrição das correções para a leitura da absorvância feitas por WARBURG & CHRISTIAN (1941), baseadas na diferença a 280 e 260 nm, subtraindo a absorção causada por nucleotídeos e ácidos nucléicos. Essa correção mostrou-se muito importante para extratos crus, todavia tornou-se menos relevante com os progressos na área de purificação de proteínas, quando a maioria dos compostos interferentes foram removidos. Nesse caso, a simples leitura da absorção a 280 nm é suficiente ( SCOPES, 1982).

Desde que o conteúdo dos aminoácidos responsáveis pela absorção a 280 nm varia enormemente de proteína para proteína, o coeficiente de extinção, tanto expresso na forma de  $E_{280}^{1\%}$  como  $E_{280}^{1\text{mg/mL}}$ , varia consideravelmente. Para 1mg/mL a maioria das proteínas apresenta uma absortividade na faixa de 0,4 a 1,5 ; os extremos, entretanto, incluem desde algumas parvalbuminas e outras proteínas relacionadas ligadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , com absortividade igual a 0,0 , até o outro extremo representado pela lisozima, cuja absortividade é de 2,65. Assim, a medida da absorção a 280 nm confere apenas uma idéia grosseira do conteúdo protéico de uma amostra, exceção feita às proteínas em estado puro ( SCOPES, 1982).

Em função do desenvolvimento tecnológico na década de 50, nos anos 60 já se tornou possível discutir o espectro de absorção da ligação peptídica ( WETLAUFER, 1962). Foram

importantes para tanto, a minuciosa revisão de BEAVEN & HOLIDAY (1951) e os trabalhos de SAIDEL et al. (1952), reportando investigações no espectro dos aminoácidos mais comuns, bem como em amostragem sistemática de peptídios simples. Tais resultados foram suplementados com outros dados de aminoácidos, peptídios e soro-albumina bovina em soluções aquosas e filmes sólidos, utilizando vácuo. Demonstrou-se, assim, que a ligação peptídica apresenta um pico de absorção máximo a aproximadamente 185 nm, conclusão que foi posteriormente confirmada pela utilização de espectro na fase de vapor e por tentativas de transferência de transição de amidas simples. Nessa mesma época outros pesquisadores se detiveram no estudo da absorção de filmes sólidos de aminoácidos e peptídios na faixa de 145 a 240 nm (WETLAUFER, 1962).

Os estudos citados permitiram evidenciar o espectro de absorção dos aminoácidos, bem como mostraram que as proteínas apresentam uma banda de absorção de altíssima intensidade próxima a 190 nm; colocaram em evidência a existência de uma banda semelhante para peptídios simples, cuja absorvidade ampliava-se com o aumento do comprimento nas cadeias nos oligopeptídios; mostraram, ainda, a existência de banda semelhante para derivados N-acetil ou N-glicil de quase todos os aminoácidos comuns. Tais fatos somados constituíram forte evidência na associação da banda a 190 nm à ligação peptídica, induzindo a uma conclusão aproximada de que tais ligações se comportem como cromóforos isolados (WETLAUFER, 1962).

Partindo-se de amostras de ácido poli-L-glutâmico, evidenciou-se que o espectro de absorção desse peptídio era dependente da conformação estrutural. Nesse aspecto, GOLDFARB et

al. (1951) haviam demonstrado que a absorvância de soluções de soro-albumina bovina a 205 nm aumentava após pequeno aquecimento a 100°C. Na ocasião, haviam sugerido que, nesse comprimento de onda, a absortividade poderia estar relacionada à estrutura peptídica da proteína. A escolha do ácido poli-glutâmico foi oportuna e proporcionou a mais convincente demonstração para tal conclusão, uma vez que a transição da hélice nesse material era bem estabelecida. Posteriormente, a confirmação da dependência do estado de conformação foi demonstrada para poli-lisina, poli-ácido glutâmico e várias proteínas nas formas nativa e desnaturada (WETLAUFER, 1962).

Basicamente, foi a partir dessa demonstração e de sua repercussão no meio científico que a faixa espectral entre 180 e 210 nm passou a ser acessível nos espectrofotômetros comerciais, incluindo componentes óticos e mudanças apropriadas a esses comprimentos de onda.

Além da absorção provocada pelo oxigênio gasoso no caminho ótico, o oxigênio dissolvido nos solventes comuns contribui com absorvância de magnitude variável. Entre 200 e 215 nm a absortividade molar da água é muito maior que na fase de vapor, resultado que pode ser interpretado como devido às estruturas das ligações ou pontes de hidrogênio, ou, alternativamente, como um processo de transferência de carga por contato. Independentemente da interpretação mais correta, na investigação do espectro de absorção de uma solução é necessário o conhecimento da absorção induzida pelo oxigênio, não somente nas soluções aquosas, mas até mais fortemente em solventes orgânicos (alcanos, alcoóis, éter, aromáticos, etc...). Nos estudos espectrais em meios aquosos, deve-se recordar que os íons

orgânicos, incluindo cloretos e hidroxil, absorvem apreciavelmente ao redor de 200 nm. Trabalhos sobre o espectro de absorção ultravioleta de alguns íons orgânicos são úteis nessas circunstâncias. Por outro lado, detalhes experimentais úteis para a obtenção de espectros nesses comprimentos de onda com instrumentos comerciais podem ser encontrados nos trabalhos de WETLAUFER, (1962) e SCOPES, (1974 e 1982).

GOLDFARB et al. ( 1951 ) mostrou que, para várias proteínas, a absorptividade molar por ligação peptídica a 205 nm diminui na faixa superior a 260 nm, e que essa absorptividade representa cerca de 70 a 85% da absorptividade total ( BEAVEN & HOLIDAY, 1952). Dois problemas maiores inviabilizam a leitura da absorptividade da ligação peptídica a nível de seu pico máximo, a aproximadamente 192 nm. Primeiro, por tratar-se de região normalmente inacessível nos espectrofotômetros elétricos comerciais e, segundo, devido, principalmente, à absorção provocada pelo oxigênio nesse comprimento de onda ( BEAVEN & HOLIDAY, 1952; SCOPES, 1982).

A absorção seletiva da ligação peptídica, no entanto, estende-se a uma região muito maior do espectro, sendo perfeitamente acessível na região dos 200-230 nm nos espectrofotômetros comerciais. Essa absorção decresce rapidamente com o aumento do comprimento de onda; entretanto, ainda é apreciável mesmo a 253 nm, havendo autores que consideram sua extensão até a região de 270-280 nm ( BEAVEN & HOLIDAY, 1952).

A medida da absorção na região de absorptividade da ligação peptídica tem sido considerada por vários autores (GOLDFARB et al., 1951; WETLAUFER, 1962; SCOPES, 1974 e 1982; KIRSCHENBAUM, 1984) como método mais sensível e muito menos

afetado pela composição de aminoácidos da proteína. A impossibilidade da determinação da absorvância a nível do pico máximo não exclui essa região do espectro para fins analíticos. Embora o máximo de absorção seja desejado, a forma da curva como um todo é também específica da estrutura da proteína ( GOLDFARB et al., 1951; La BORDE et al., 1979 ). De acordo com SCOPEES (1974, 1982) e WHITAKER & GRANUN (1980), a medida da absorvância no lado possível da banda oferece resultados suficientemente precisos. SCOPEES (1982) insere a relação dos coeficientes de extinção para proteínas nessa região, mostrando sua variação. Para soluções protéicas de 1mg/mL os coeficientes de extinção, para alguns comprimentos de onda são:

-no pico a	192 nm	: 60
	200 nm	: 45
	205 nm	: 31
	206 nm	: 29
	210 nm	: 20
	215 nm	: 15
	220 nm	: 11.

Na realidade, tais valores variam de proteína para proteína, tanto pela variável contribuição dos aminoácidos aromáticos e outros resíduos, como também pela influência da estrutura secundária ( alfa-hélice, beta-"pleated sheet"), que imprime pequena variação na forma e posição exata do pico de absorção da ligação peptídica, porém sempre de maior intensidade quanto menor o comprimento de onda ( SCOPEES, 1982). De acordo com esse mesmo autor, levando em conta as possíveis variações, os valores mais consistentes podem ser obtidos ao redor de 205 nm, onde o coeficiente de extinção situa-se na faixa de 28,5 a 33.



Fazendo correções para o conteúdo de tirosina e triptofano, o coeficiente de extinção a 205 nm pode ser predito com menos de 2% de erro, mesmo para mistura de proteínas, pela fórmula:

$$E_{205}^{1\text{mg/mL}} = 27,0 + 120 \times \frac{A_{280}}{A_{205}} \text{ (SCOPEL, 1974 e 1982).}$$

A exploração prática dessa região do espectro para fins bioquímico-analíticos iniciou-se, fundamentalmente, com o trabalho de WADDELL & HILL (1956). Seu objetivo foi a determinação da concentração protéica em amostras normais e anormais de plasma humano, fluido cérebro-espinal e líquido pleural. Para tanto, preferiu a utilização da diferença de absorvância a dois comprimentos de onda (215-225 nm) objetivando minimizar o erro de possíveis constituintes não protéicos das amostras. O trabalho levou esses autores a concluir que o método espectrofotométrico apresentava grandes vantagens sobre os demais, principalmente sobre o método de Kjeldhal, mormente pela simplicidade, rapidez e sensibilidade. A medida precisa do conteúdo de proteína foi possível para concentrações tão baixas quanto 5 µg/mL. O grau de sensibilidade permitiu a aplicação do método nos procedimentos em que se desejava avaliar a concentração protéica em pequenos volumes de materiais biológicos. A precisão e sensibilidade desse método foram confirmadas por BENDIXEN (1957) para estimação da concentração protéica em soro e fluido cérebro-espinal e por MURPHY & KIES (1960) na monitoração da separação cromatográfica de proteínas do cérebro de cobaia.

TOMBS et al. (1969) trabalhou com a determinação espectrofotométrica de proteínas (frações protéicas do soro sanguíneo) a 210 nm. Nesse trabalho, sugeriram que o melhor

comprimento de onda para a determinação de proteínas seria a 205 nm; porém, a qualidade do equipamento levou-os a selecionar outro comprimento de onda, discutindo, ainda, vários problemas associados à idade da lâmpada e ao espalhamento da radiação, problemas esses que podem ser resolvidos com a calibração cuidadosa.

WEBSTER (1970), usando soro bovino como padrão e algumas proteínas comerciais, apresentou resultados comparativos sobre sensibilidade, precisão e repetibilidade das estimações protéicas a vários comprimentos de onda: 280, 215-225, 210 e 191 nm.

Em 1979, La BORDE et al. reportaram a utilização do método de WADDELL para a estimação da concentração total de proteínas em tecidos embrionários de roedores. Nesse campo de desenvolvimento da biologia, necessitavam de um procedimento que fosse rápido, preciso e não destrutivo, para que as determinações pudessem ser realizadas em quantidades de material muito pequenas. A alta precisão e repetibilidade encontrada determinaram a conclusão desses autores, tornando o método de WADDELL mais atrativo e fidedigno que o método de LOWRY, com o qual o compararam.

SCOPES (1974) preferiu redefinir um método para a medida da concentração de proteínas utilizando a banda de absorção da ligação peptídica a 205 nm. Trabalhando com várias proteínas, concluiu que esse procedimento é suficientemente preciso para a maioria dos propósitos, com variação de apenas 2% quando tomadas corretas precauções, além de ser fácil e rápido.

Pelos motivos já apresentados, a escolha ou seleção do melhor comprimento de onda na região do ultravioleta para a

determinação da concentração protéica de materiais biológicos permanece arbitrária, variando de acordo com as preferências dos pesquisadores e das limitações dos equipamentos disponíveis ( LA BORDE et al., 1979; SCOPES, 1974).

WHITAKER & GRANUN (1980) preferiram a utilização da diferença da absorvância a 235 e 280 nm, a qual chamaram de "um método absoluto para a determinação de proteínas", embora em dados anteriores WHITAKER (1972) houvesse manifestado a opinião de que a sensibilidade poderia ser melhorada pela determinação da concentração protéica na região de 215 a 225 nm.

IWAIDA et al. (1967), seguindo a mesma preocupação de outros autores, utilizaram a espectrofotometria no ultravioleta para a determinação do conteúdo protéico do leite, obtendo altas correlações com o método de Kjeldhal, com  $r=0,9965$  para 243 nm e  $r=0,9976$  para 285 nm.

KUAYE (1989) propôs um novo método espectrofotométrico para a determinação quantitativa de proteínas em amostras de leite, baseado no deslocamento da absorção seletiva do aminoácido tirosina, em solução fortemente alcalina, para comprimentos de onda entre 247 e 257 nm.

REICHARDT & DROESE (1982), partindo de amostras de leite desnatado cuja proteína total foi determinada pelo método de Kjeldhal, compararam tais resultados com os obtidos através da medida da absorvância a 280 e 210 nm. A 280 nm, a correlação estimada foi de  $r=0,72$ , enquanto a 210 nm, a coincidência das medidas da absorvância com os valores de proteína total foi de  $r=0,99$  ou mais, quando as amostras foram diluídas em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS).

O SDS é um detergente que apresenta algumas propriedades importantes: nas concentrações necessárias, sua absorvibilidade nessa região do espectro é muito pequena; atua sobre possíveis resíduos de gordura eliminando interferências; evita a aderência ou adsorção da proteína à "cubeta"; e, principalmente, dissocia a proteína em sub-unidades desenrolando completamente cada cadeia polipeptídica para formar um complexo alongado em bastonete ( REICHARDT & DROESE, 1982; LENNIGHER, 1976; REYNOLDS & TANFORD, 1970 e SCOPES, 1982).

O leite possui cor dominante e, mesmo em soluções diluídas, é responsável por níveis de opacidade que dificultam as análises espectrofotométricas (IWAIDA et al., 1976). A maneira clássica de obtenção de filtrados transparentes, nos casos de avaliação da atividade proteolítica, utilizada quase na totalidade dos métodos, é através da precipitação das proteínas com ácido tricloroacético (TCA), seguida de centrifugação e/ou filtração. Ainda que tal procedimento possibilite a análise espectrofotométrica na região visível do espectro, no ultravioleta, dificulta-a pois, assim como uma série de outros compostos como acetatos, succinatos, citratos, ftalatos e barbituratos, o TCA absorve fortemente na região dos 200-230 nm (VILELA et al., 1973). Por outro lado, as soluções protéicas, nessa mesma região do espectro, obedecem à lei de BEER\*, desde

---

\*Lei de BEER ou BEER-LAMBERT: Incrementos sucessivos no número de moléculas de igual poder de absorção, situadas no percurso de um feixe de radiação monocromática, absorvem iguais frações da energia radiante que os atravessa.

que a absorvância seja inferior a 2,0 ; sendo praticamente invariável e independente do pH entre 4,0 e 8,0. Substâncias como cloreto de sódio, sulfato de amônio, borato, fosfato e tris, nas concentrações necessárias, não interferem na absorção ( VILELA et al., 1973; SCOPES, 1982 ).

A quase totalidade das proteínas purificadas são incolores quando em solução; não absorvem, portanto, na região visível do espectro. Conforme enfatizaram BEAVEN & HOLIDAY (1952), essa transparência é uma propriedade notável das proteínas e derivados, responsável pela extensão da absorção para a região ultravioleta do espectro. Convém ressaltar os aspectos comentados por WETLAUFER (1962), pelos quais a maneira mais simples para explicar o espectro de absorção de uma proteína é através da somatória do espectro de absorção de seus componentes, oferecendo resultados muito aproximados do espectro observado da proteína. Assumir a propriedade da aditividade é condição básica para a utilidade das aplicações analíticas. Exemplo bastante fundamentado na prática rotineira é a estimacão da concentração de resíduos tirosil e triptofil numa proteína, a partir de determinacões da absorvância, e da concentraçao de proteína, empregando-se os coeficientes de extincão dos resíduos tirosil e triptofil. Do mesmo modo, outra forma de determinacão da concentraçao de proteína é pela medida da absorvância na banda de absorçao da ligacão peptídica.

Utilizando espectrofotômetros de rotina para estimacões na região ultravioleta, uma vez que tais comprimentos de onda situam-se próximos aos limites desses aparelhos, são necessários alguns cuidados básicos: "cubetas" de quartzo extremamente limpas, tampões com absorçao mínima e lâmpada de deutério

relativamente nova ( SCOPES, 1982).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. SOLUÇÕES E REAGENTES

SOLUÇÃO DE FENOL REAGENTE - A cada mL do reativo de Folin-Ciocalteu (reagente comercial Merck), foram adicionados 2mL de água destilada, soluções essas renovadas semanalmente, estocadas em refrigerador e ao abrigo da luz.

SOLUÇÃO DE CARBONATO DE SÓDIO A 15% - Foram pesadas 150g de Carbonato de Sódio anidro, dissolvidas em água destilada, posteriormente elevando-se o volume para 1000mL.

SOLUÇÃO DE ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (TCA) - A partir de reagente analítico (MERCK, VETEC, INLAB - min.99%) foi preparada uma solução de Ácido Tricloroacético a 12%.

SOLUÇÃO DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO - Mensalmente foi preparada uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio a 0,5% em água destilada deionizada. ( SDS ou Lauril Sulfato de Sódio-SIGMA ).

SOLUÇÕES PROTÉICAS DE PADRONIZAÇÃO - Várias soluções de diferentes proteínas e oligopeptídeos foram preparadas e utilizadas na padronização do método espectrofotométrico na

região do ultravioleta (UV).

Normalmente se preparava uma solução mãe e, dessa, uma solução de uso, geralmente em termos percentuais, numa relação peso/volume ( p/v ). Para tanto, foram utilizadas: Soro-albumina bovina e Caseína bovina (SIGMA), Caseína bovina (RIEDEL), o dipeptídio Glicil-prolina e o tripeptídio Valilglicilglicina (cristalizados- SIGMA). Tais soluções foram preparadas em tampão fosfato 0,1M e pH 6,7.

**ESTABELECIMENTO DE CURVA PADRÃO COM TIROSINA** - Inicialmente foi preparada uma solução padrão dissolvendo-se 100mg de Tirosina cristalizada (MERCK) em água destilada, elevando-se o volume para 500mL. Dessa, tomou-se 10mL e completou-se o volume para 100mL com água destilada, obtendo-se uma concentração de Tirosina equivalente a 0,02mg/mL, utilizada no estabelecimento da curva padrão a 650nm. ( Pontos da curva padrão: 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 ug de tirosina no tubo de reação, em duplicatas).

## 2. DIÁLISE

Foram adquiridas membranas de celulose importadas, fornecidas em rolos, sem costura e com diâmetro achatado de aproximadamente 32mm e diâmetro aberto de aproximadamente 20mm. A capacidade especificada pelo fabricante era de 100mL/pé ( aproximadamente 100mL/30,5cm ) e com capacidade de retenção de



mais de 99% de uma solução de Citocromo C ( PM 12400 ), durante um período de 10 horas de diálise.

Para a preparação dos sacos de diálise, os rolos foram cortados em segmentos de aproximadamente 25cm de comprimento, exaustivamente lavados e fervidos em água destilada deionizada. Após resfriados à temperatura ambiente, foram testados quanto às possíveis interferências nas provas espectrofotométricas, tanto na região do visível quanto no ultra-violeta (UV). Não havendo interferências em tais provas, a preparação era dada por encerrada e as membranas eram estocadas em água destilada e deionizada em refrigerador, renovando-se o estoque a cada 15 dias.

Antes de receber o material a ser dialisado, procedeu-se à oclusão de uma das extremidades do segmento através de um duplo nó da membrana sobre si mesma. Em seguida a amostra era depositada no interior da membrana e a extremidade livre também ocluída, procedendo-se do mesmo modo que na extremidade anterior. Para auxiliar na movimentação e retirada dos sacos de diálise após a incubação, uma das extremidades era amarrada com um pedaço de barbante de algodão que, apesar de lavado e previamente testado, não entrava em contato com o meio de diálise, permanecendo com uma extremidade fora do tubo de ensaio.

Após a colocação da amostra (10mL), oclusão e colocação do barbante, os sacos de diálise eram cuidadosamente lavados em água destilada corrente e, em seguida, colocados em tubos de ensaio de 25x200mm, recebendo a seguir a água destilada em quantidade padronizada para a realização da diálise (20mL), e levando-se à incubação a 37°C por um período de 2 horas.

Terminada a incubação procedia-se à retirada dos sacos de diálise com o auxílio da extremidade livre do barbante, dispensando-se os sacos e procedendo-se às análises necessárias no meio dialisado remanescentes nos tubos de ensaio. ( MISTRY & KOSIKOWSKI, 1983; CRAIG & KING, 1966).

Foram também adquiridas membranas de celulose industrial, nacionais, utilizadas como envoltório de alimentos embutidos, fornecidas em bobinas, sem costura e com diâmetro achatado de aproximadamente 28mm, que foram preparadas, testadas, estocadas e utilizadas em condições idênticas às anteriormente descritas.

### 3. TESTES PRELIMINARES

#### 3.1. ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)

Durante a fase de padronização da metodologia espectrofotométrica na região do ultravioleta foram utilizados quatro diferentes espectrofotômetros, todos com duplo feixe, a saber: Varian S-634; Shimadzu; Specord ( fenda automática ) e Beckman ( UV 5270, "servo slit, scan speed = 1/2 nm/seg." e fenda fixa de 1mm.).

Após essa fase, todas as leituras do experimento, nessa região do espectro foram realizadas num único espectrofotômetro ( Shimadzu ) com lâmpada de Deutério nova e "cubetas" de quartzo apropriadas à região de 165 a 2600nm, com dimensões externas de 12,5mm x 12,5mm x 45mm; capacidade de 3mL e percurso da luz de 10mm.

### 3.2. ENSAIO ENZIMÁTICO

A verificação da atividade proteolítica "in vitro" foi realizada utilizando-se a enzima tripsina ( de pâncreas suíno - EC 3.4.21.4 ) em concentração de 0,241mg/mL em tampão fosfato 0,02M e pH 6,6 (KWAN et al., 1983). Os ensaios foram comparativos, isto é, com amostras de leite tripsinizadas contra amostras do mesmo leite sem a adição da enzima. Nas amostras a concentração enzimática foi de aproximadamente 400 ppm, com incubação a 37°C por tempo variável entre 10 e 180 minutos (MISTRY & KOSIKOWSKI, 1983; DAVIS & SMITH, 1967).

### 3.3. CONTAGENS MICROBIOLÓGICAS

As estimativas microbiológicas foram realizadas em 110 amostras de leite cru, utilizando-se o método de Contagem Padrão em Placas (CPP), seguindo-se estritamente a metodologia descrita no "Standard Methods for the Examination of Dairy Products-1978".

Utilizou-se o meio desidratado "Agar Plate-Count" (Agar peptona de Caseína, Glicose e Extrato de Levedura) da MERCK, preparado de acordo com as instruções do fabricante. O plaqueamento foi realizado em duplicatas, com incubação a 32°C por 48 horas.

#### 4. ESTIMAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

##### 4.1. MÉTODO DE HULL - EQUIVALENTES DE TIROSINA (TE)

O método de HULL foi utilizado seguindo-se a metodologia descrita por MISTRY & KOSIKOWSKI (1983), tanto no que se refere à obtenção do filtrado das amostras com TCA quanto àquelas submetidas ao processo de diálise. Assim, a 5mL das amostras (filtrado ou dialisado) foram adicionados 10mL de solução de Carbonato de Sódio a 15% seguida de agitação e adição de 3mL da solução de Fenol-reagente previamente preparada. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente ao abrigo da luz, as amostras eram levadas à leitura espectrofotométrica (Absorvância a 650nm), sempre em duplicatas.

#### 4.2.MÉTODO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV)

A definição do melhor comprimento de onda para a realização das leituras foi fixada em 220nm, levando-se em conta, para tanto, as características dos espectros de absorção previamente determinados; a característica, amplitude e invariabilidade da resposta para uma mesma concentração protéica; a possibilidade da existência de interferências indesejáveis; complementados por ensaios de Exatidão Fotométrica em obediência à lei de BEER.

A seguir, procedeu-se à padronização do protocolo da reação. Assim, a cada 500uL do dialisado das amostras, dispensados em tubos de ensaio em duplicatas, adicionou-se 4,5mL de solução de SDS a 0,5%, levando-se à incubação a 20°C por 60 minutos, ao abrigo da luz. Após esse período foram realizadas as leituras da absorvância a 220nm contra branco da amostra, constituído de 500uL de água destilada e 4,5mL de SDS a 0,5%.

### 5.AMOSTRAS

#### 5.1.LEITE CRU

**5.1.1. AMOSTRAS INDIVIDUAIS-** Foram colhidas 30 amostras individuais (por animal) de leite recém-ordenhado de vacas clinicamente sadias, em diferentes estágios do período de lactação, pertencentes ao plantel da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAVJ), da Universidade Estadual Paulista - UNESP.

**5.1.2. AMOSTRAS COLETIVAS-** Parte das amostras coletivas, isto é, do conjunto da produção, foram obtidas junto ao estábulo da FCAVJ-UNESP; e parte obtida diretamente dos latões dos produtores junto à plataforma de recepção de indústria de laticínios da região (Taquaritinga-SP).

## **5.2. QUEIJOS**

Todas as amostras de queijo foram adquiridas no comércio ou diretamente do distribuidor da região.

Foram adquiridas 10 amostras de queijo Minas tipo "frescal", em unidades inteiras pesando de 800 a 1100g cada, de três fabricantes distintos, sendo dois regulares (produção industrial) e um de produção artesanal, geralmente adquiridas no primeiro dia de comercialização da produção, correspondendo a produtos com um ( 1 ) dia desde a data de fabricação.

No laboratório, todas as amostras de queijos foram divididas em 6 partes mais ou menos iguais, constituindo 6 sub-

amostras, que foram embaladas individualmente em papel alumínio, colocadas em embalagens plásticas fechadas e estocadas em refrigerador. Durante todo o período de estocagem refrigerada ( 21 dias ), a intervalos regulares procedeu-se à retirada de uma sub-amostra de cada amostra para as análises necessárias.

Cada sub-amostra era subdividida, o mais homoganeamente possível, em 10 pedaços com as mesmas características. De um desses pedaços era pesada uma alíquota de 20g que, posteriormente era macerada em gral e pistilo de porcelana, com adição de 30mL de água destilada e deionizada, até completa homogeneização. Dessa, alíquotas de 10mL em triplicatas eram colocadas para dialisar contra água destilada, em incubação a 37°C por 120 minutos.

Os demais pedaços de cada sub-amostra eram colocados para prova de degustação por voluntários (docentes e funcionários) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FCAVJ-UNESP, em provas individuais não sugestivas, onde tais provadores respondiam espontaneamente sobre aroma/cheiro, gosto ou sabor, sabor residual e textura do produto.

### 5.3. LEITE LONGA-VIDA

As amostras de leite longa-vida ( UHT 145-150°C/3" ) foram adquiridas no comércio, seguindo-se a observação da data de fabricação e prazo de validade, estocadas em temperatura ambiente desde a aquisição até o final do experimento, num período

variando de 6 ( análise mais precoce após a data de fabricação) até 280 dias (realização da última análise).

Para esse tipo de leite a amostragem foi constituída de cinco lotes de sete (7) unidades (litros) cada um, de marcas diferentes e teores de gordura variando entre 0%, 2% e integral. Dentro de cada lote as unidades foram escolhidas como sendo as mais homogêneas possíveis, obtendo-se uma sequência de embalagens dentro de uma mesma caixa, representando uma mesma partida. A intervalos de tempo durante toda a estocagem, uma unidade de cada lote era tomada para a realização das análises pretendidas, totalizando sete (7) determinações para cada lote.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

#### 1.1. DIÁLISE COMPARATIVA

Inicialmente, com o objetivo da obtenção de parâmetros de avaliação, visando uma possível substituição da membrana de celulose importada por motivos de facilidade, praticidade e custo, foi delineado um experimento comparativo de diálise empregando simultaneamente a membrana importada e a membrana nacional (industrial), em duplicatas.

A membrana de diálise importada, utilizada neste trabalho, apresentava capacidade de retenção especificada de 12400 Daltons, portanto, teoricamente permeável para a maioria dos fragmentos, mesmo iniciais, oriundos da atividade proteolítica. A atividade das proteases (nativas e microbianas) sobre as proteínas do leite inicialmente gera fragmentos protéicos de tamanhos variáveis, cujo PM se situa entre 2700 a 28000 Daltons, embora a quase totalidade desses fragmentos se situe entre 2700 e 12200 Daltons.

Uma vez que o emprego da diálise objetivava a obtenção e separação dos produtos de proteólise do leite e derivados para

posterior análise e estimação da atividade proteolítica, uma gama variada de amostras, constituída de leite individual recém-ordenhado, leite coletivo, leite pasteurizado tipos "B" e "C", leite longa-vida (UHT), iogurte e queijo tipo "Minas Frescal"; foram submetidas à diálise em ambas as membranas simultaneamente.

Ao todo, cento e vinte e sete (127) amostras foram submetidas a essa comparação e, ao dialisado delas foi aplicado o método de Hull para estimação da atividade proteolítica, com leitura espectrofotométrica da absorvância a 650nm. Os resultados dessas análises encontram-se relacionados na Fig. I, representados pelas médias das duplicatas.

Esses resultados foram submetidos ao teste estatístico de correlações simples ou de dados pareados, por entendermos sê-lo o mais apropriado na comparação de possíveis resultados, iguais ou diferentes, obtidos por um único método em circunstâncias pouco diferenciadas. Assim, o coeficiente de correlação ( $r$ ) foi de 0,9856,  $r^2=0,9714$  e a equação da reta  $y = 0,9912x - 0,0017$ , onde  $y$  foi representado pelos resultados da membrana importada e  $x$  pelos da membrana nacional.

Desses resultados pode-se depreender que, embora não tenham sido ensaiados testes refinados de limites de exclusão molecular para as membranas em comparação, não há diferenças significativas entre os limites de retenção ou exclusão dessas duas membranas de celulose para os elementos que foram avaliados pelo método de Hull. Esses resultados já eram, de alguma maneira, esperados, pois temos o conhecimento de que vários pesquisadores em nosso meio fazem o uso da membrana nacional em outras variadas situações onde a diálise é necessária, sempre em função das

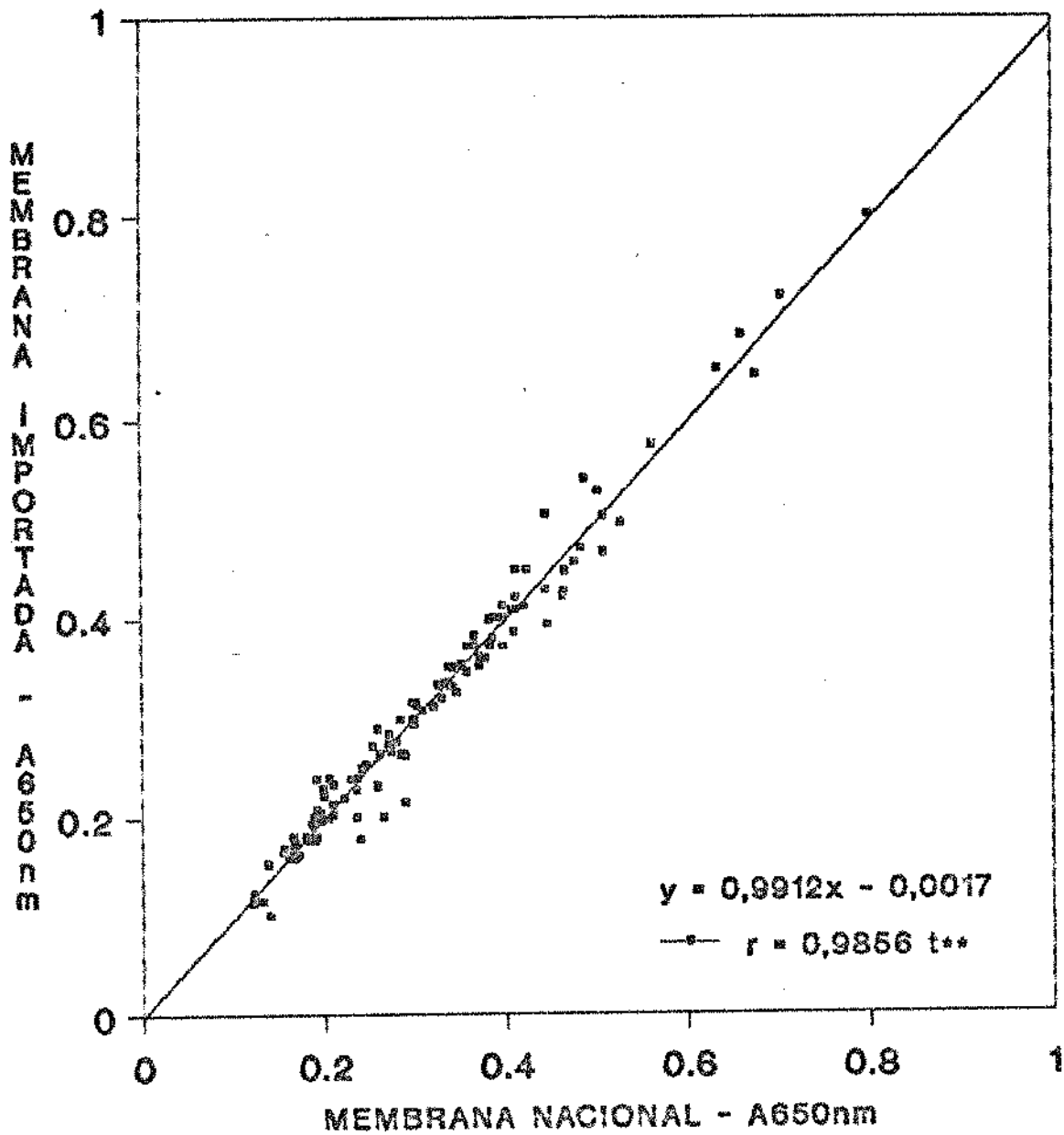


Fig.1. Relação da diálise comparativa de amostras de leite e derivados em membrana de celulose importada e nacional.

dificuldades de importação, principalmente no que se refere a custos.

A par desses resultados, para os objetivos inerentes a esse trabalho, pudemos constatar que a membrana nacional parece ser mais grosseira na sua constituição e apresentação, demandando maiores cuidados durante sua preparação. Ainda, em função de possíveis irregularidades ou mesmo perfurações existentes na membrana, houve a necessidade de se trabalhar com triplicatas, uma vez que nos pré-testes foi comum a perda de amostras por ocorrência de vazamentos. Assim, trabalhando com triplicatas resguardou-se o aproveitamento das duplicatas dos resultados.

## 1.2. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

### 1.2.1. DEFINIÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA.

Inicialmente, como condição fundamental, foram obtidos os espectros de absorção de algumas soluções protéicas puras, em concentrações conhecidas, contra branco constituído de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,5%. O comportamento desses espectros pode ser verificado nas figuras II e III. A Fig. II mostra o espectro de absorção de duas concentrações ( 50 e 100 ug/mL ) de soro-albumina bovina, na região do ultravioleta, entre 200 e 300 nm. A Fig. III mostra o espectro de absorção para a caseína bovina nessa mesma região do espectro, para três diferentes concentrações protéicas ( 50 ug/mL , 100 ug/mL e 1 mg/mL ).

é interessante observar que tais resultados são praticamente idênticos aos reportados por GOLDFARB et al.(1951), WETLAUFER (1962), WHITAKER (1972 e 1980) e SCOPES (1982).

Ao comparar-se a Fig.II com a III, pode-se verificar uma discreta diferença entre as curvas para albumina e as curvas para caseína numa mesma concentração. Observa-se, no primeiro caso, que as curvas se apresentam ligeiramente menores nos vários comprimentos de onda, entretanto não comprometem os resultados.

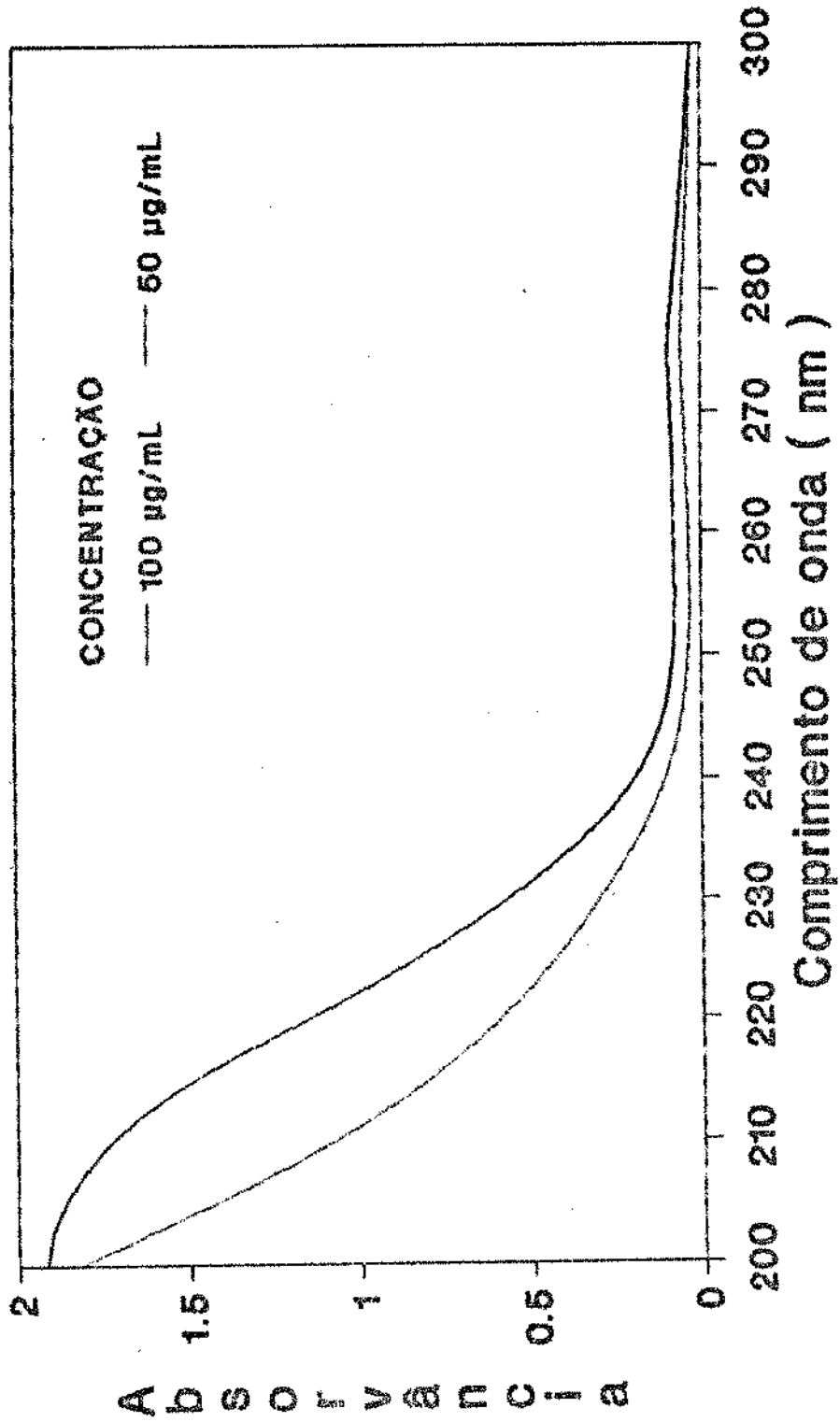


Fig.II. Espectro de absorção de Soro-  
-albumina bovina na região Ultravioleta  
( 200 a 300 nm - Fenda autom.).

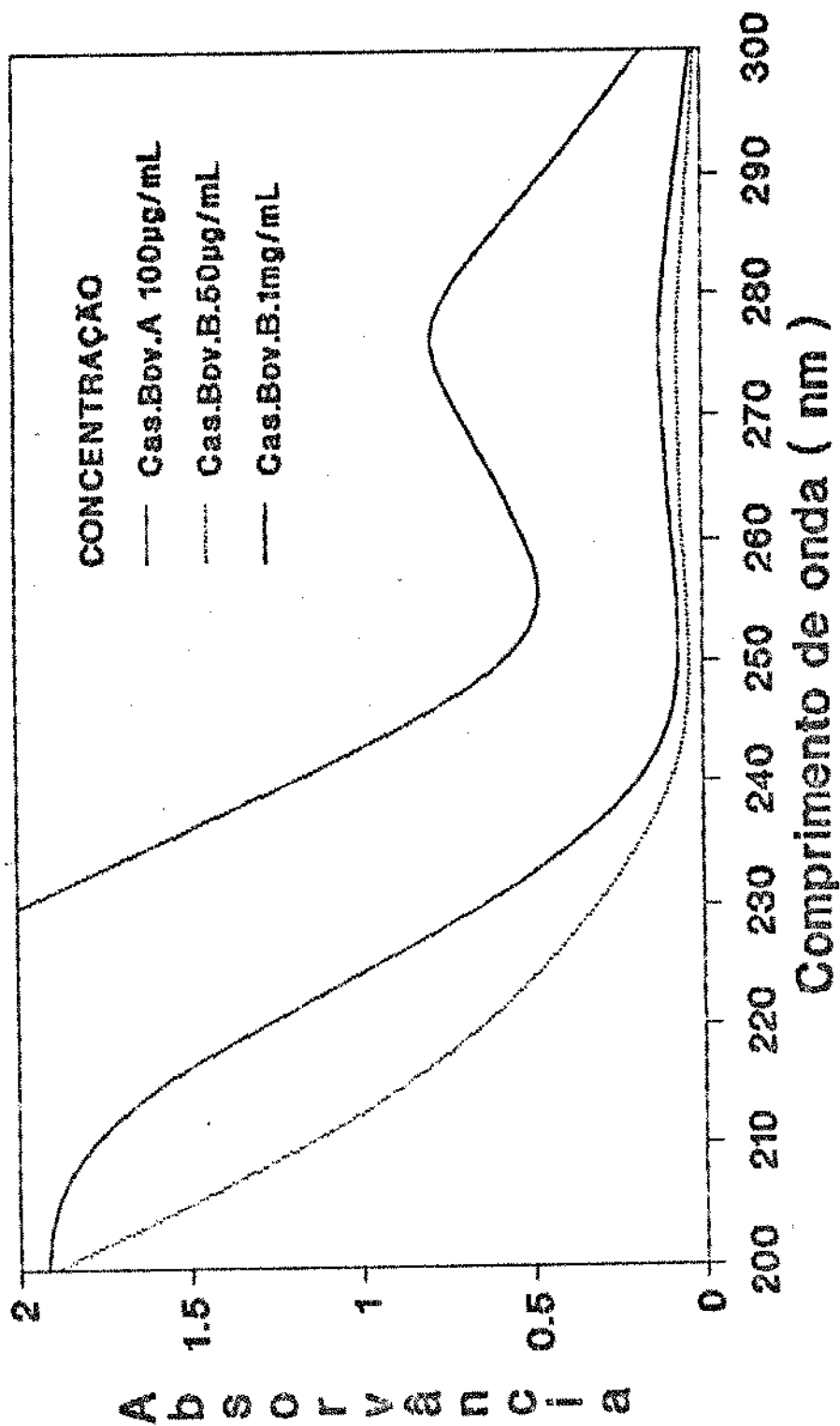


Fig. III. Espectro de absorção de Caseína bovina de diferentes procedências na região Ultravioleta (200 a 300 nm - F.A.).

Esse fato está de acordo com as observações de LABORDE et al. (1979), que preferiram não utilizar padrões protéicos de albumina humana ou bovina, justificando que a pesagem exata dessas proteínas é dificultada pela intensa absorção de umidade, além da acentuada capacidade de aderência a vidro, que impedem a preparação fidedigna de soluções padrão.

Mesmo frente a esse pequeno problema pode-se constatar, na Fig.II, a coincidência da Absorvância a 210 e 220 nm com os valores dos coeficientes de extinção ( $E_{1\text{mg/mL}}$ ) para proteínas em geral, relacionados por SCOPES (1982). A exemplo, para 210 nm, constata-se uma absorvância próxima de 1,000 para 50 ug/mL, correspondendo ao  $E_{1\text{mg/mL}} = 20$ . Do mesmo modo, para 220 nm verificam-se absorvâncias próximas de 1,100 e 0,550, respectivamente para 100 e 50 ug/mL, mais uma vez coincidindo com os valores de  $E_{1\text{mg/mL}} = 11$ .

Por outro lado, os resultados da Fig.III mostram absorvâncias ligeiramente superiores aos dados de  $E_{1\text{mg/mL}}$  relacionados por SCOPES (1982). Há que se ressaltar que os resultados do presente trabalho são brutos, isto é, não sofreram qualquer tipo de correção para os comprimentos de onda utilizados, de certo modo explicando essas pequenas diferenças, uma vez que os dados de SCOPES (1982) foram corrigidos, eliminando interferências de outras substâncias com absorvidade, principalmente em comprimentos de onda inferiores a 230 nm.

Em função da grande utilização do método de determinação de proteínas no ultravioleta com leitura na região dos 280nm, na Fig.III procurou-se mostrar, comparativamente, os



espectros de absorção para a caseína bovina. Pode-se verificar que, para evidenciar um pico satisfatório na região dos 280 nm, mais precisamente a 278 nm, foi necessária uma concentração protéica 10 a 20 vezes superior que a utilizada em comprimentos de onda menores que 230 nm. A exemplo, o valor do pico máximo a 278 nm para a concentração de 1mg/mL, é exatamente igual, em números absolutos, à leitura em 215 nm para uma concentração protéica 20 vezes menor, isto é, 50 ug/mL. Essa sensibilidade é a maior vantagem para a utilização de comprimentos de onda entre 210 e 230 nm.

Esses resultados, somados a outros determinados no presente trabalho, deram origem ao Quadro I, onde procurou-se relacionar, comparativamente, os valores de  $E_{1\text{mg/mL}}$  das soluções protéicas utilizadas como padrão neste trabalho com os dados mais recentes da literatura. Mais uma vez ressaltando que tais resultados não sofreram qualquer tipo de correção, constata-se, principalmente entre 210 e 220 nm, praticamente uma coincidência com os dados apresentados por SCOPES (1982).

Para comprimentos de onda mais próximos de 200 nm pode-se verificar uma maior discrepância nos resultados, explicada principalmente pelo limite operacional do espectrofotômetro utilizado neste trabalho, conforme se verifica nas Figs. II e III para a concentração de 100 ug/mL de proteína nas amostras. Nesses casos, abaixo de 210 nm ocorreram verdadeiros platôs nas curvas de absorção, verificando-se que posteriores incrementos na concentração não corresponderam aos necessários incrementos de absorvidade.

QUADRO I. Comparação de alguns Coeficientes de Extinção ( $E_{1\text{mg/mL}}$ ) determinados no presente trabalho para algumas soluções protéicas puras, na região do Ultravioleta, com os dados da literatura.

Comprimento de onda ( nm )	Soro-Albumina Bovina*	Caseína**	Caseína*	Dipeptídeo Glicil-L-prolina*	Média Geral ( X* )	Proteínas em Geral***
192	---	---	---	---	---	60,0
200	36,6	37,0	---	---	37,2	45,0
205	29,0	31,0	31,2	---	30,4	31,0
206	26,8	29,4	---	---	28,1	29,0
210	19,1	21,0	19,7	21,0	20,2	20,0
215	15,0	16,2	16,4	16,0	15,9	15,0
220	11,1	12,2	12,8	10,9	11,7	11,0
225	8,2	9,0	8,2	---	8,5	---
230	5,3	6,2	6,3	---	5,9	---
278	---	---	0,82	---	---	---

\* SIGMA / \*\* RIEDEL / \*\*\* SCOPES (1982). / X\* = Média dos resultados para as várias proteínas determinadas no presente trabalho.

De posse desses resultados passou-se à determinação do melhor comprimento de onda para a realização das leituras nessa região do espectro ( 210 a 230 nm ). Nesse caso, para as várias soluções protéicas estudadas, foram realizados ensaios com concentrações crescentes e a verificação do comportamento dessas adições para alguns comprimentos de onda previamente selecionados. Corroborando com essa definição, foram também estudadas as curvas de exatidão fotométrica na faixa de

obediência à Lei de Beer. Esses resultados encontram-se configurados nas Figs. IV e V.

A Fig. IV mostra o efeito aditivo de concentração crescente de uma solução de caseína bovina a 210, 220 e 225 nm. A Fig. V mostra esse mesmo efeito para uma solução do dipeptídeo glicil-L-prolina apenas a 220 nm. Na realidade as retas obtidas podem, inclusive, ser utilizadas como curvas padrão para os respectivos comprimentos de onda.

Nas Figs. IV e V observa-se que, para concentrações variando entre 10 e 100 ug/ml, a 220 nm há uma perfeita correspondência entre concentração e absorvância, numa fiel obediência à lei de BEER, com equações de regressão iguais a  $y=1,015x + 0,002477$  para a caseína bovina e  $y=1,077x - 0,006589$  para a glicil-L-prolina.

Para 225 nm, na Fig. IV, embora se tenha obtido também uma reta, com equação  $y=0,7764x + 0,003823$ , observa-se uma acentuada diminuição do ângulo de inclinação, responsável pela extensão da faixa de obediência à lei de BEER, mas ao mesmo tempo, pela diminuição da sensibilidade. O inverso ocorre com a curva observada a 210 nm que, para concentrações superiores a 40 ug/mL, não corresponde com os necessários aumentos na absorção, e embora aumente a sensibilidade para concentrações diminutas, limita a faixa de obediência à lei de BEER, sendo inclusive explicada por uma equação polinomial de 2º grau:  $y = -0,4964x^2 + 1,864x - 0,0006431$ . Essas conclusões ficam ainda mais evidentes ao plotar os resultados em curvas de exatidão fotométrica, com a concentração em função da % de Transmitância.

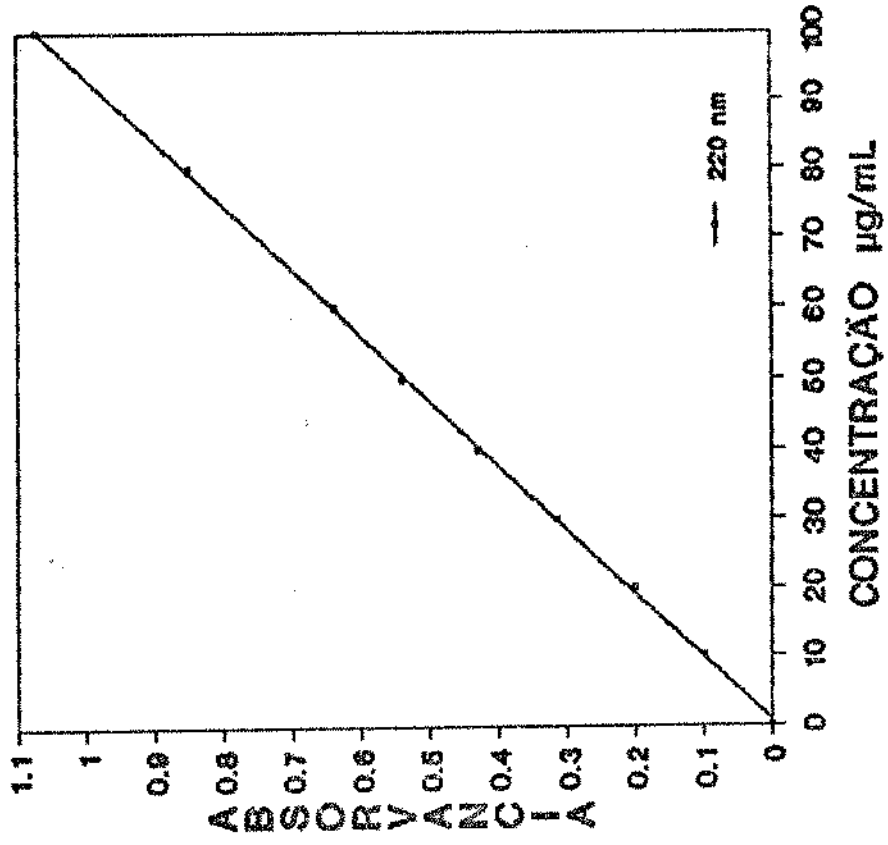


Fig.V.Efeito da adição de concentração de Glicil-L-prolina sobre a absorção a 220 nm.

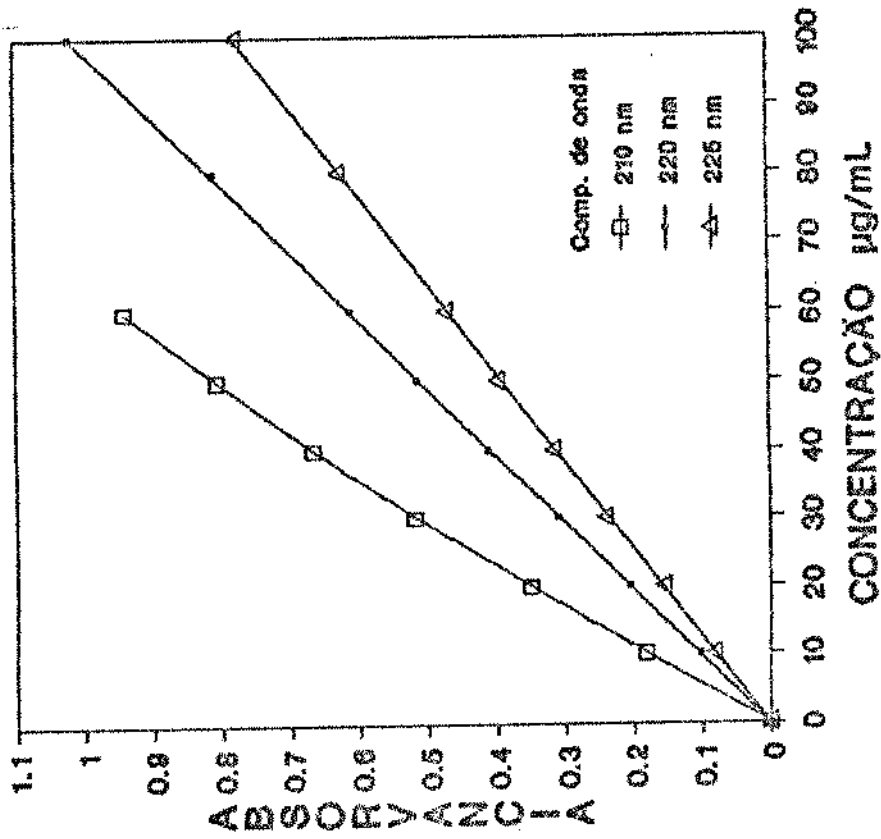
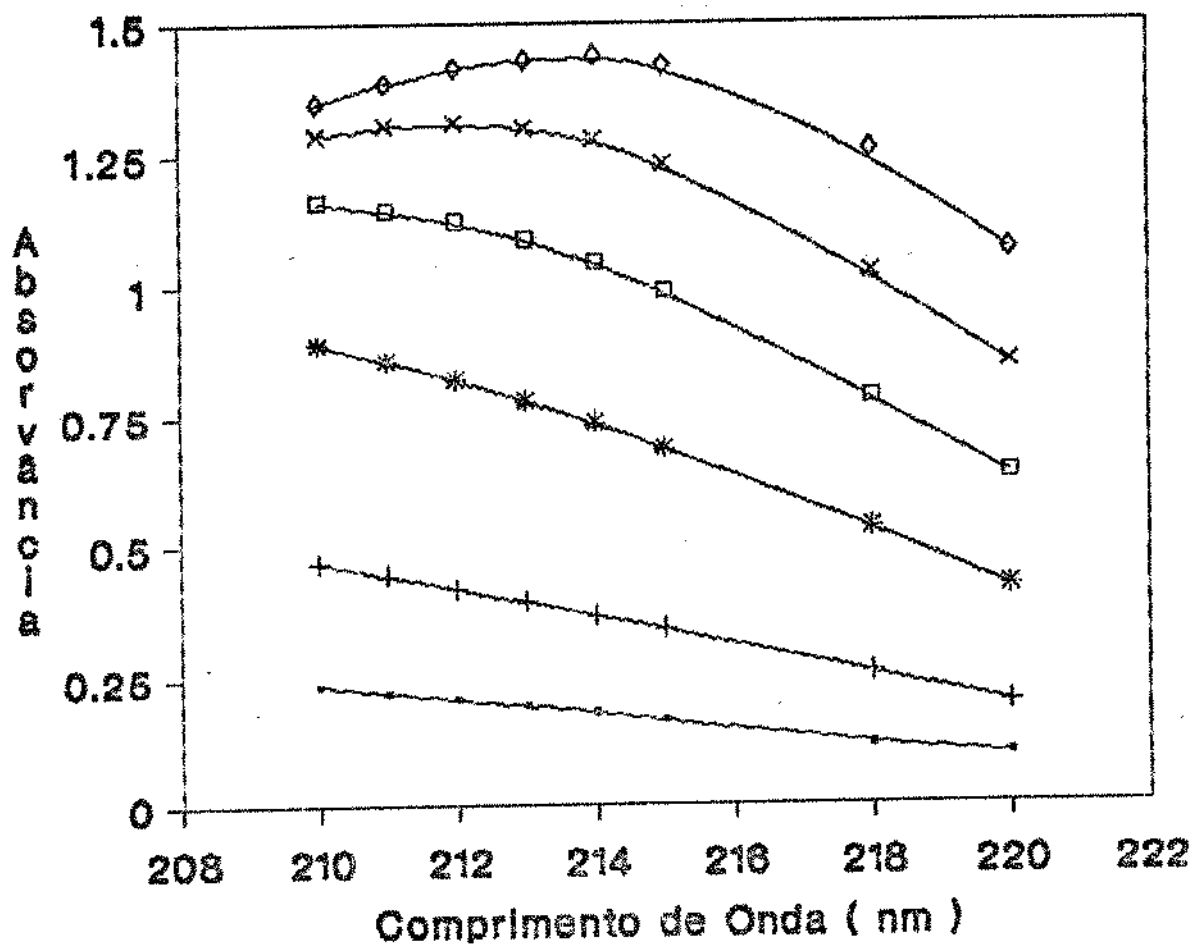


Fig.IV.Efeito da adição da concentração de Caseina sobre a absorção, para alguns comprimentos de onda no UV.

Esses resultados podem ainda ser comprovados pela análise da Fig.VI, onde, de outra maneira, são colocados os valores da absorvância obtida para uma mesma concentração de um tripeptídeo a vários comprimentos de onda entre 210 e 220 nm. Nessa figura são apresentadas seis (6) curvas, correspondendo a concentrações crescentes ( 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ug/mL ) de valilglicilglicina. Observa-se que, para a faixa de absorvância entre 0,2 e 1,0 , a melhor e mais fidedigna correspondência com os sucessivos incrementos de concentração do tripeptídeo ocorreu para o comprimento de onda de 220 nm. Evidentemente, por outro lado, em condições muito bem definidas e controladas, principalmente com a utilização de soluções protéicas puras, pode-se buscar maior sensibilidade em comprimentos de onda menores, como a 210 nm onde a obediência à Lei de Beer ocorre para concentrações protéicas entre 10 e aproximadamente 50 ug/mL.



Concentração

—●— 10 µg/mL      —+— 20 µg/mL      —\*— 40 µg/mL  
 —□— 60 µg/mL      —x— 80 µg/mL      —◇— 100 µg/mL

Fig.VI.Comportamento do espectro de absorção de diferentes concentrações de tripeptídio entre 210 e 220 nm.

### 1.2.2. ASSOCIAÇÃO DA DIÁLISE À DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA.

Em seguida, tornou-se necessário associar a diálise à determinação espectrofotométrica na região dos 210-220nm do UV. Para tanto, concentrações crescentes do dipeptídeo glicil-L-prolina foram adicionadas a amostras de leite, contra amostras do mesmo leite sem a sua adição, sendo essas submetidas à diálise em incubação a 37°C por duas (2) horas, sempre em duplicatas. Os resultados da recuperação do dipeptídeo no dialisado são mostrados na Fig.VII, para os comprimentos de onda de 210 e 220nm.

Observa-se, a 220 nm, que há perfeita correspondência entre aumento da concentração do dipeptídeo, recuperado após a diálise, e aumento da absorvância. Já, a 210 nm, essa correspondência não é mais linear; ocorrendo aumento da sensibilidade à baixas concentrações e, posteriormente, em concentrações maiores, havendo decréscimo da absorvância, deixando de existir correspondência linear entre concentração e absorção. Esses mesmos fatos já foram notados e comentados para a curva padrão com caseína bovina ( Fig.IV ).

A recuperação do dipeptídeo no dialisado, evidenciada a 220 nm, proporcionalmente à concentração adicionada ao leite, corresponde às expectativas de definição e padronização de um método espectrofotométrico nessa região. MISTRY & KOSIKOWSKI (1983) obtiveram comprovação semelhante da diálise para a região

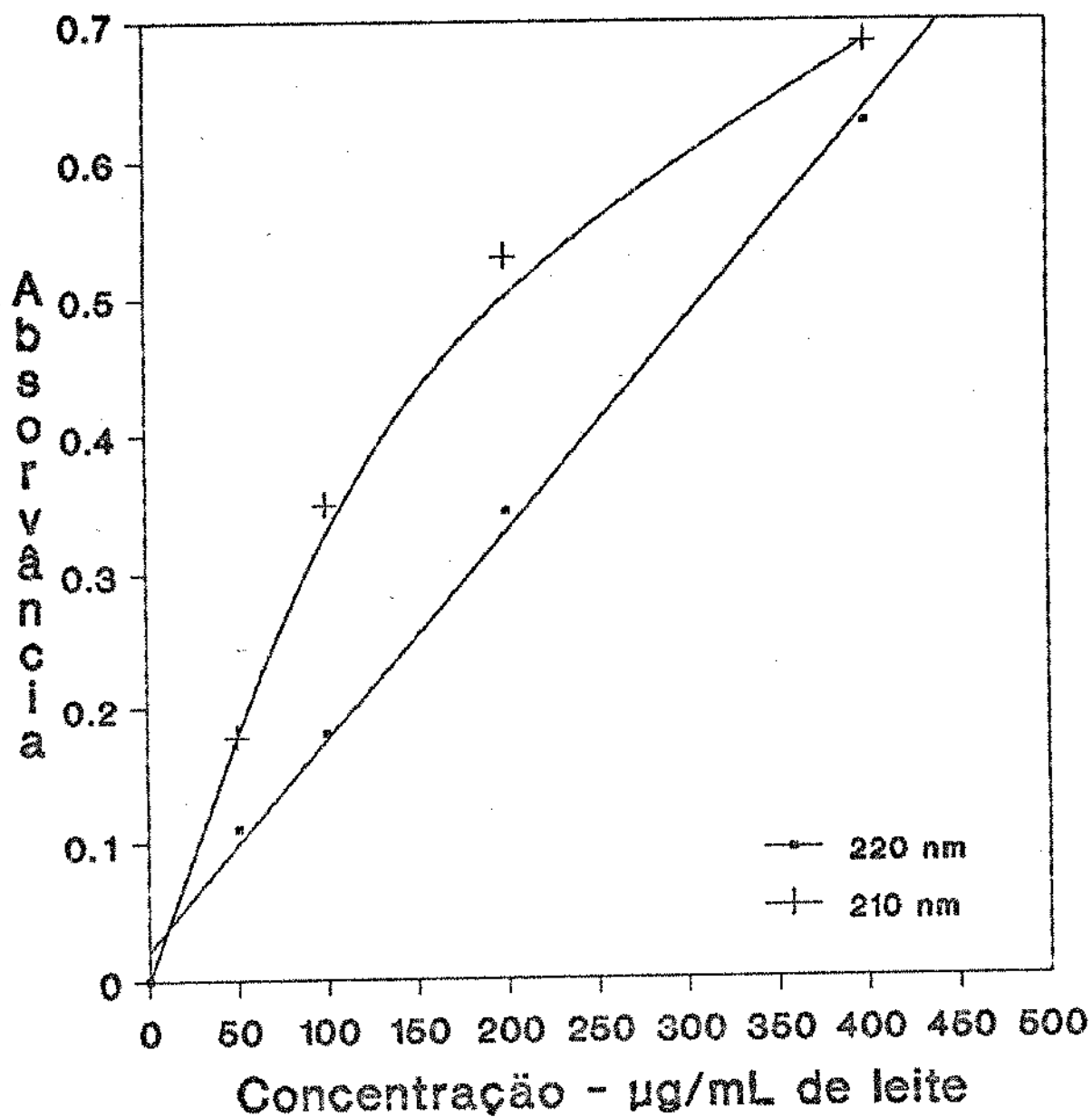


Fig.VII. Curvas de recuperação do dipeptídeo adicionado a amostras de leite em concentrações crescentes, após a diálise



visível do espectro, utilizando a recuperação de tirosina previamente adicionada a amostras de leite.

Essa comprovação faz-se necessária uma vez que, ao dialisado são aplicados os métodos de estimação da atividade proteolítica, dosando substâncias como aminoácidos e oligopeptídios dialisáveis. Todavia, substâncias de pequeno peso molecular como as citadas não se configuram como parâmetros seguros, vez que são facilmente dialisáveis e provavelmente não correspondam aos produtos iniciais da proteólise.

Outra maneira de comprovar a eficiência da metodologia proposta na estimação da atividade proteolítica, foi realizada através de ensaios enzimáticos com tripsina sobre o leite cru recém-ordenhado. Assim, em cinco repetições para amostras em duplicatas, procurou-se determinar o efeito proteolítico da tripsina, em concentração de 400ppm no leite, durante a diálise com incubação a 37°C, frente a amostras do mesmo leite não tripsinizado. Durante todo o tempo de incubação das amostras, que foi de 180 minutos, a intervalos de tempo variáveis foram tomadas alíquotas do dialisado e submetidas à determinação espectrofotométrica. Os resultados desses ensaios podem ser analisados na Fig. VIII.

Em função dos resultados obtidos anteriormente, neste caso, as leituras espectrofotométricas foram fixadas a 220 nm. Observou-se, em todas as repetições, nítida indicação da atividade proteolítica promovida pela enzima tripsina, conforme se verifica pela média dos resultados sumarizados na Fig. VIII. Deve-se atentar para o fato de que a curva mostrada (Proteólise efetiva) corresponde à atividade proteolítica efetivamente

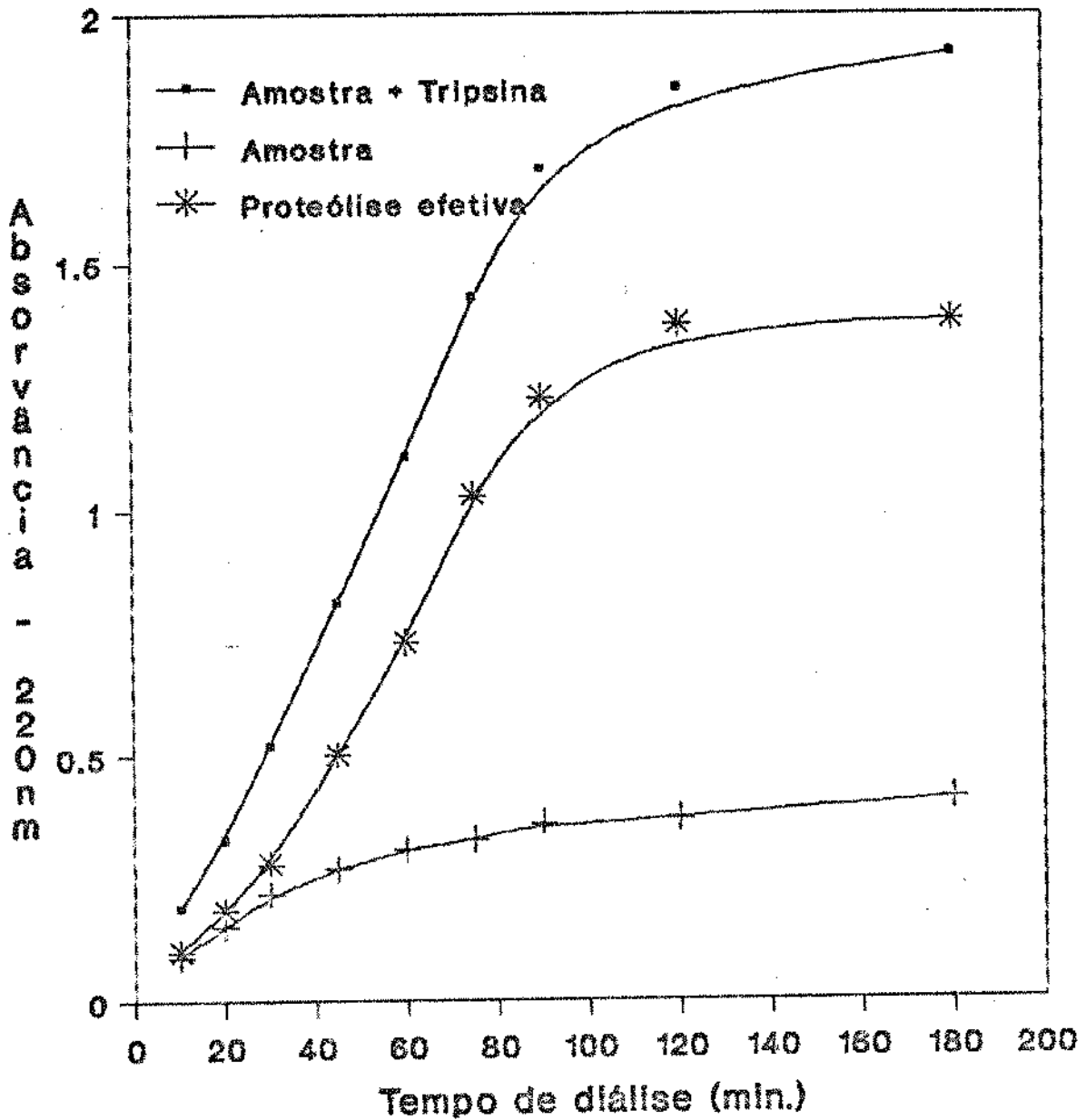


Fig.VIII. Proteólise enzimática por tripsina no leite (400ppm) em função do tempo de diálise, a 220 nm.

promovida pela ação enzimática, uma vez que tais experimentos foram comparativos, já descontados os valores pertinentes à evolução proteolítica de amostras pareadas do mesmo leite sem a adição da enzima.

### 1.2.3.COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS

Padronizada a metodologia, passou-se à comparação dos métodos ( Hull e UV-220nm ) na estimação da atividade proteolítica de amostras de leite submetidas à diálise.

Inicialmente, procurou-se avaliar a atividade proteolítica original do leite. Para tanto, leite individual recém-ordenhado, de trinta fêmeas clinicamente normais e em diferentes estágios do período de lactação, foi obtido e imediatamente analisado. Os resultados podem ser observados no Quadro II e Fig. IX.

Apesar da amostragem, os resultados apresentaram distribuição normal, com valores médios de absorvância de  $0,327 \pm 0,058$  para o método UV-220nm e  $0,177 \pm 0,040$  para o método de Hull. Os coeficientes de variação (CV) foram, respectivamente, 17,74% e 22,60%.

Na Fig. IX verifica-se que os resultados apresentam distribuição normal muito parecidas, diferindo em valores absolutos em função dos protocolos de reação utilizados em cada método. Assim, verifica-se identidade parcial entre os métodos que, de maneiras diferentes, estimam uma mesma variável.

Posteriormente procurou-se avaliar a evolução proteolítica natural de amostras de leite cru recém-ordenhado. Para tanto, cada amostra cuidadosamente colhida foi assepticamente dividida e estocadas a 6°C até sua coagulação

QUADRO II .Resultados comparativos da atividade proteolítica original, de amostras de leite individual recém-ordenhado, estimada pelos métodos de Hull ( $A_{650nm}$ ) e Ultra-violeta ( $UV-A_{220nm}$ )\*\*\*.

AMOSTRA	$A_{650nm}$	Equiv.de TIROSINA* ( ug )	$A_{220nm}$	Equiv.de DIPEPTÍDIO** ( ug )
01	0,162	74,3	0,306	24,5
02	,252	115,6	,415	33,2
03	,121	55,5	,230	18,4
04	,183	83,9	,361	28,9
05	,176	80,7	,322	25,8
06	,233	106,9	,413	33,0
07	,236	108,3	,358	28,6
08	,163	74,8	,316	25,3
09	,120	55,0	,266	21,3
10	,209	95,9	,346	27,7
11	,178	81,6	,322	25,8
12	,184	84,4	,395	31,6
13	,124	56,9	,436	34,9
14	,173	79,4	,374	29,9
15	,186	85,3	,390	31,2
16	,160	73,4	,279	22,3
17	,244	111,9	,400	32,0
18	,231	106,0	,405	32,4
19	,167	76,6	,299	23,9
20	,180	82,6	,350	28,0
21	,134	61,5	,254	20,3
22	,163	74,8	,272	21,8
23	,172	78,9	,324	25,9
24	,114	52,3	,248	19,8
25	,185	84,9	,316	25,3
26	,176	80,7	,285	22,8
27	,128	58,7	,305	24,4
28	,119	54,6	,252	20,2
29	,232	106,4	,328	26,2
30	,196	89,9	,250	20,0
$\bar{X}$	0,177±0,040	81,06±18,29	0,327±0,058	26,18±4,64
CV		22,6%		17,7%

\*Equivalentes de Tirosina nas amostras referidas à curva padrão.

\*\*Equivalentes de Dipeptídeo nas amostras referidas à curva padrão.

\*\*\*Médias de duplicatas.

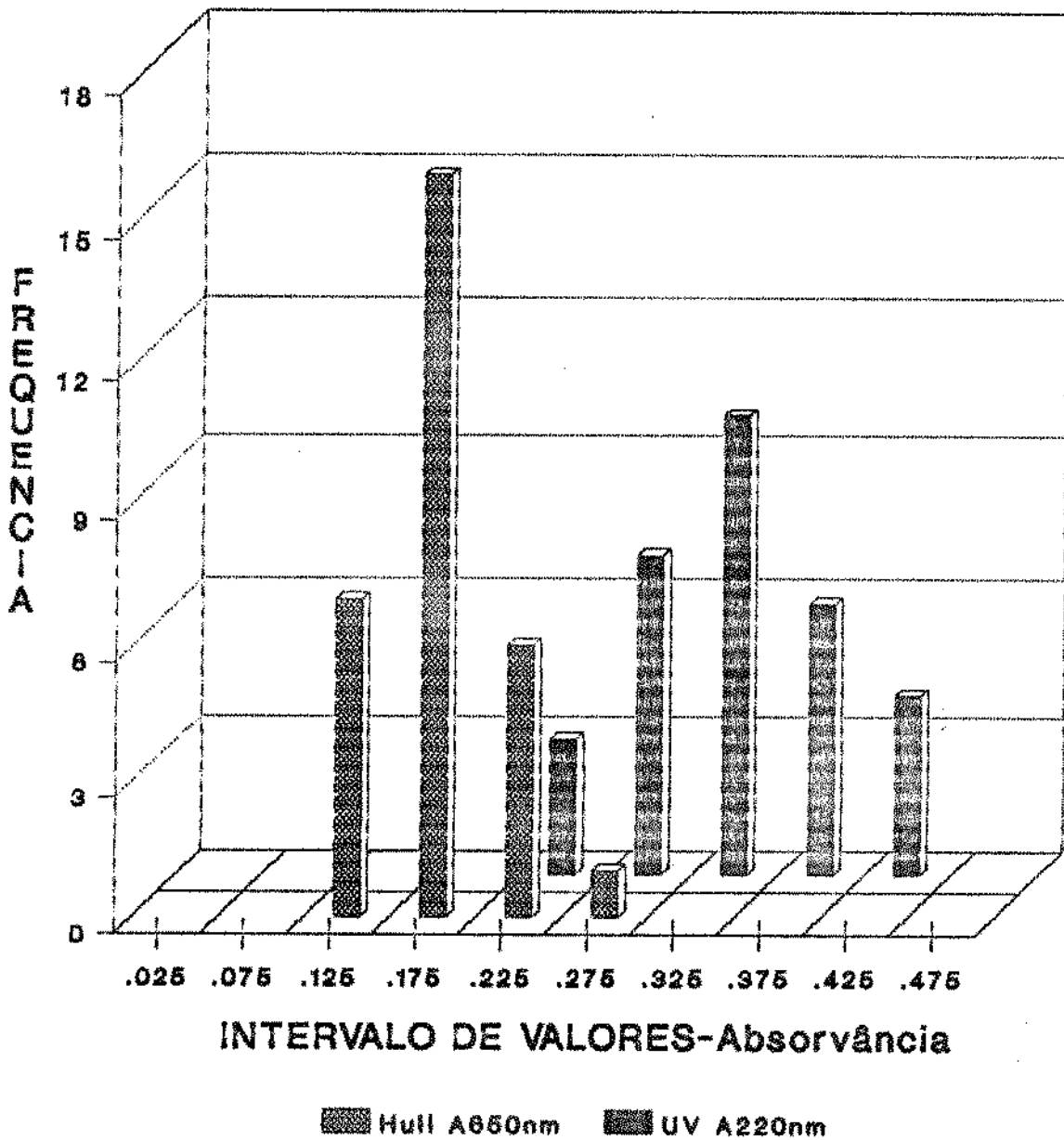


Fig.IX.Distribuição de trinta amostras de leite recém-ordenhado quanto à atividade proteolítica original.

espontânea. A intervalos de tempo essas amostras foram submetidas à diálise, em duplicatas, e à estimação da atividade proteolítica.

Pela correlação linear simples, na comparação do método de HULL com o método proposto ( A 220 nm ), obteve-se a equação  $y = 1,517x + 0,016$ , onde  $y$  refere-se a A220 nm e  $x$  a A650 nm do método de HULL, com  $r = 0,9962$ . Esses resultados podem ser verificados na Fig. X.a.

Observa-se, na comparação dos métodos, a obtenção de correlação significativa que, se submetidas à transformação dos dados para linearização ( FUJII & NAKAI, 1980) e aplicação do método de DEMING ( KWAN et al., 1983), que minimiza a importância da soma dos quadrados no tratamento estatístico, o coeficiente de correlação se apresentara muito próximo de 1,00.

De outra maneira, os mesmos resultados podem ser constatados na Fig. X.b., onde procurou-se caracterizar a tendência de evolução proteolítica para cada um dos métodos. Observa-se que a tendência evolutiva determinada para ambos os métodos é praticamente a mesma, com diferença apenas de sensibilidade em favor do método ultravioleta.

Esse aspecto pode ser melhor enfatizado pela análise dos resultados do Quadro II. Nesse caso pode-se verificar que, para o método de HULL, com leituras a 650 nm, foram necessárias em média  $81,06 \pm 18,29$  ug de equivalentes de tirosina nas amostras para obter-se absorvância média de  $0,177 \pm 0,040$ . Já para o método na região Ultravioleta, com leituras a 220 nm, em média foram necessárias apenas  $26,18 \pm 4,64$  ug de equivalentes de dipeptídio para fornecer absorvância média de  $0,327 \pm 0,058$ ; isto

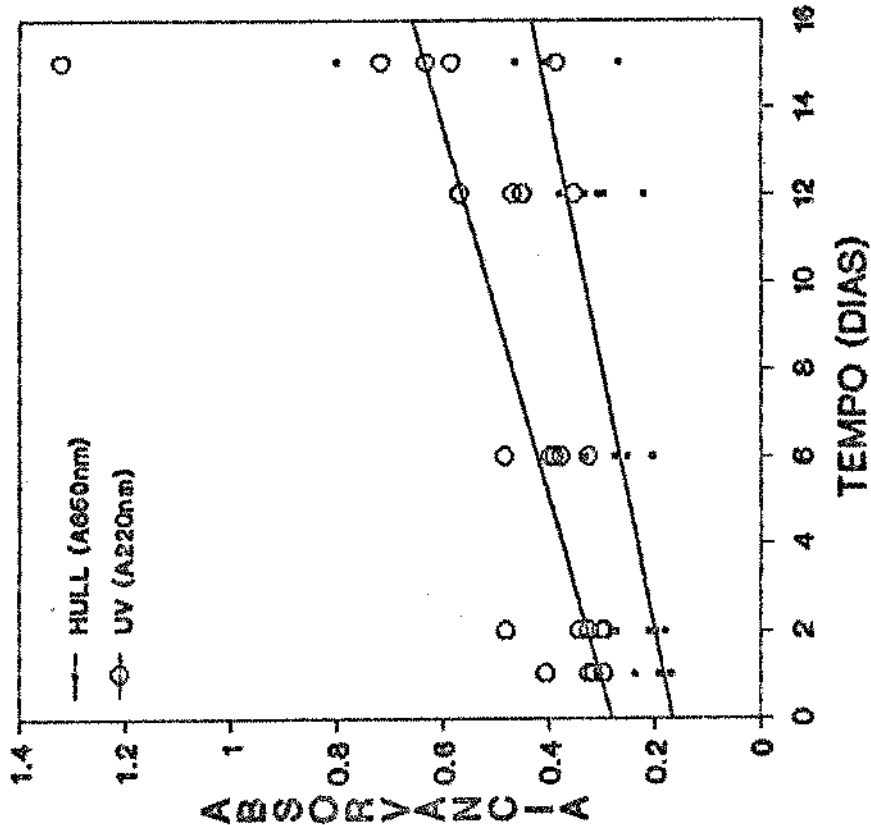


Fig.Xb.Evolução proteolítica de amostras de leite cru estocadas assepticamente, determinada pelo método de HULL e UV.

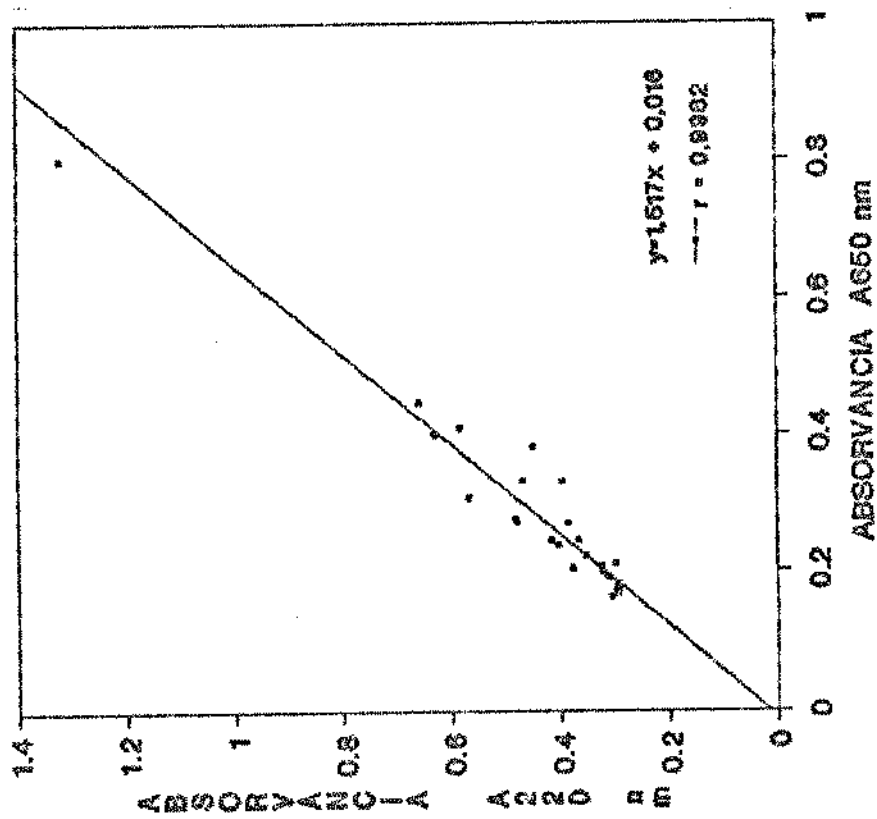


Fig.Xa.Resultado comparativo da evolução proteolítica no leite pelos métodos de Hull e Ultravioleta.



é, foram necessárias quantidades sensivelmente menores para fornecer leituras de maior magnitude. Na comparação de métodos espectrofotométricos essa é uma das principais características de sensibilidade, desde que a especificidade não seja comprometida. Assim, aos menores incrementos de substância absorvente no percurso da luz que se traduzirem em maiores incrementos de absorção, resultam conseqüentemente em aumento da sensibilidade.

Noutro aspecto, em condições ideais de trabalho, a sensibilidade do método (220 nm) na região ultravioleta do espectro poderia ser praticamente duplicada ( 1,8x ) mudando-se o comprimento de onda para realização das leituras para 210 nm, ou quase triplicada ( 2,6 a 2,8x ) respectivamente para comprimentos de onda entre 206 e 205 nm, de acordo com os dados da literatura e mesmo dos sintetizados no Quadro I do presente trabalho. Nessas circunstâncias, o intervalo de concentrações de substâncias absorventes em atendimento à lei de BEER se situaria aproximadamente entre 5 e 50 ug, correspondendo dizer-se que variações muito menores resultariam em maiores variações das leituras. Esses aspectos poderão ser melhor explorados e comprovados futuramente, uma vez que no presente trabalho não foi possível padronizar as leituras para comprimentos de onda tão baixos em função do espectrofotômetro utilizado na rotina.

Em etapa posterior, independentemente do tipo de amostra ou seu estágio proteolítico, procurou-se estabelecer a relação entre o método de HULL e o método proposto. Duzentas e vinte e duas ( 222 ) amostras variadas ( leite cru, pasteurizado e UHT, queijos tipos "Minas Frescal", "Prato" e "Gouda" e Iogurte natural ) foram submetidas à diálise e estimação da atividade

proteolítica, em duplicatas, por ambos os métodos. Esses resultados podem ser verificados na Fig. XI., comprovando essencialmente o mesmo comportamento determinado anteriormente na estimação da evolução proteolítica de algumas amostras de leite cru ( Fig. X.a.). Nesse caso, pela correlação linear, a equação da reta determinada foi  $y = 1,1926x + 0,0735$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,9296$  (t\*\*).

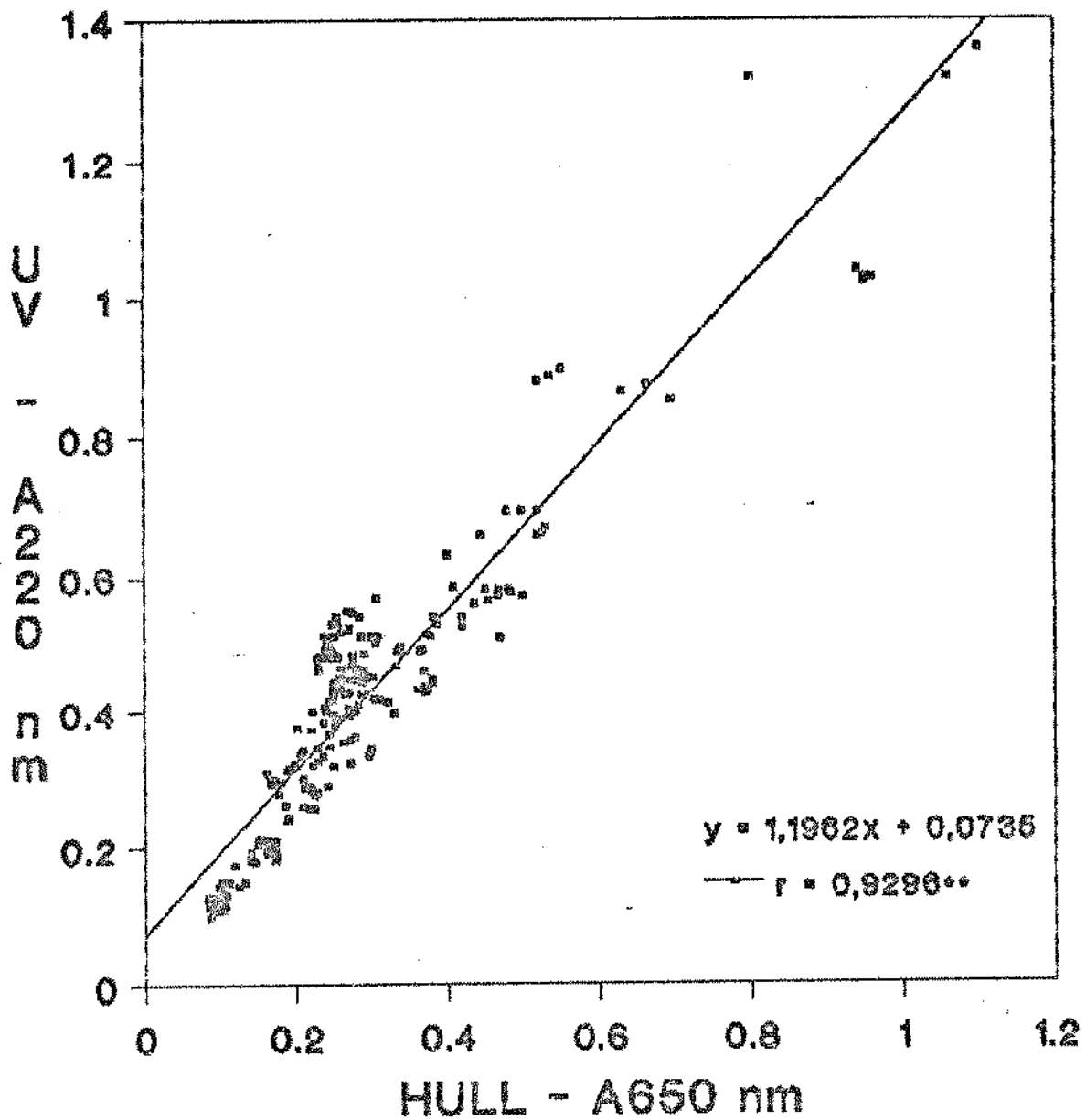


Fig.XI. Correlação entre o método de HULL e UV-220nm na estimação da atividade proteolítica de leite e derivados.

## 2. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.

### 2.1. CORRELAÇÃO ENTRE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU E ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.

A aplicação do método espectrofotométrico na região Ultravioleta, para a estimação da atividade proteolítica de leite e derivados, iniciou-se atendendo um objetivo muito simples. Na revisão feita não foi encontrado qualquer trabalho que se referisse a esses estudos em nosso meio. Assim, tendo-se em consideração principalmente as condições climáticas e as práticas vigentes no setor de laticínios, objetivou-se, inicialmente, verificar a influência da qualidade microbiológica do leite sobre os níveis originais de atividade proteolítica do mesmo.

Cento e dez (110) amostras de leite cru, obtidas em plataforma de recepção de leite de uma indústria de laticínios, foram prontamente analisadas quanto ao nível de atividade proteolítica inicial, através da diálise e estimação espectrofotométrica a 220 nm, e quanto à qualidade microbiológica, através da estimação do número de microrganismos mesófilos aeróbios totais (Contagem Padrão em Placas - CPP). Os resultados podem ser verificados na Fig. XII.

JUFFS (1973) e SHIPE et al. (1980, 1981) reportaram um aumento de tirosina (Equivalentes de Tirosina - como índice de

atividade proteolítica) no leite durante a estocagem refrigerada, coincidindo com o aumento das bactérias psicrotóxicas. JANZEN et al.(1982) identificaram uma relação direta entre o "flavour score" do leite pasteurizado e a contagem de psicrotóxicos do leite cru. MOTTAR (1981) não encontrou correlação entre a contagem total de bactérias no leite cru e atividade proteolítica residual após o tratamento por UHT. Nesse mesmo estudo, verificou que essa correlação somente ocorreu com a contagem de psicrotóxicos proteolíticos.

Os resultados deste trabalho, mais uma vez, e agora para nossas condições, evidenciaram a inexistência de correlação entre a contagem total de bactérias no leite cru e atividade proteolítica, concordando com as observações de MOTTAR(1981). A Fig.XII evidencia bem essa situação para 110 amostras de leite analisados.

Por outro lado, é interessante verificar que a média da atividade proteolítica ( estimada pelo método a  $A_{220nm}$  ) dessas 110 amostras coletivas procedentes de indústria de laticínios, foi  $0,317 \pm 0,034$  , com CV = 10,72%, muito próxima, portanto, da média anteriormente estimada para 30 amostras de leite individual que foi  $0,327 \pm 0,058$ , com CV = 17,74%. Ao somar-se esses resultados, perfazendo um total de 140 amostras, obtém-se a distribuição normal que pode ser observada na Fig.XIII.

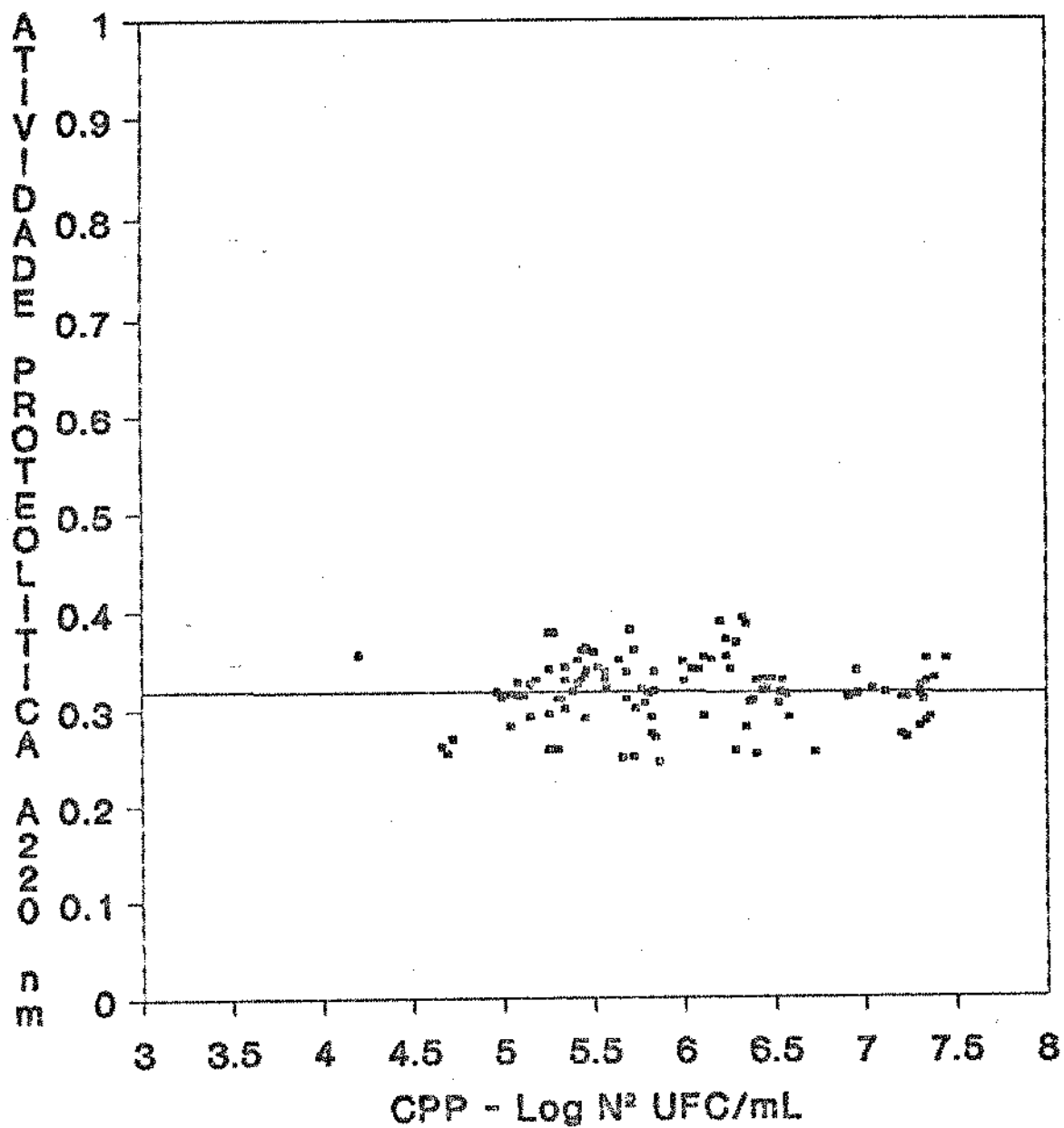
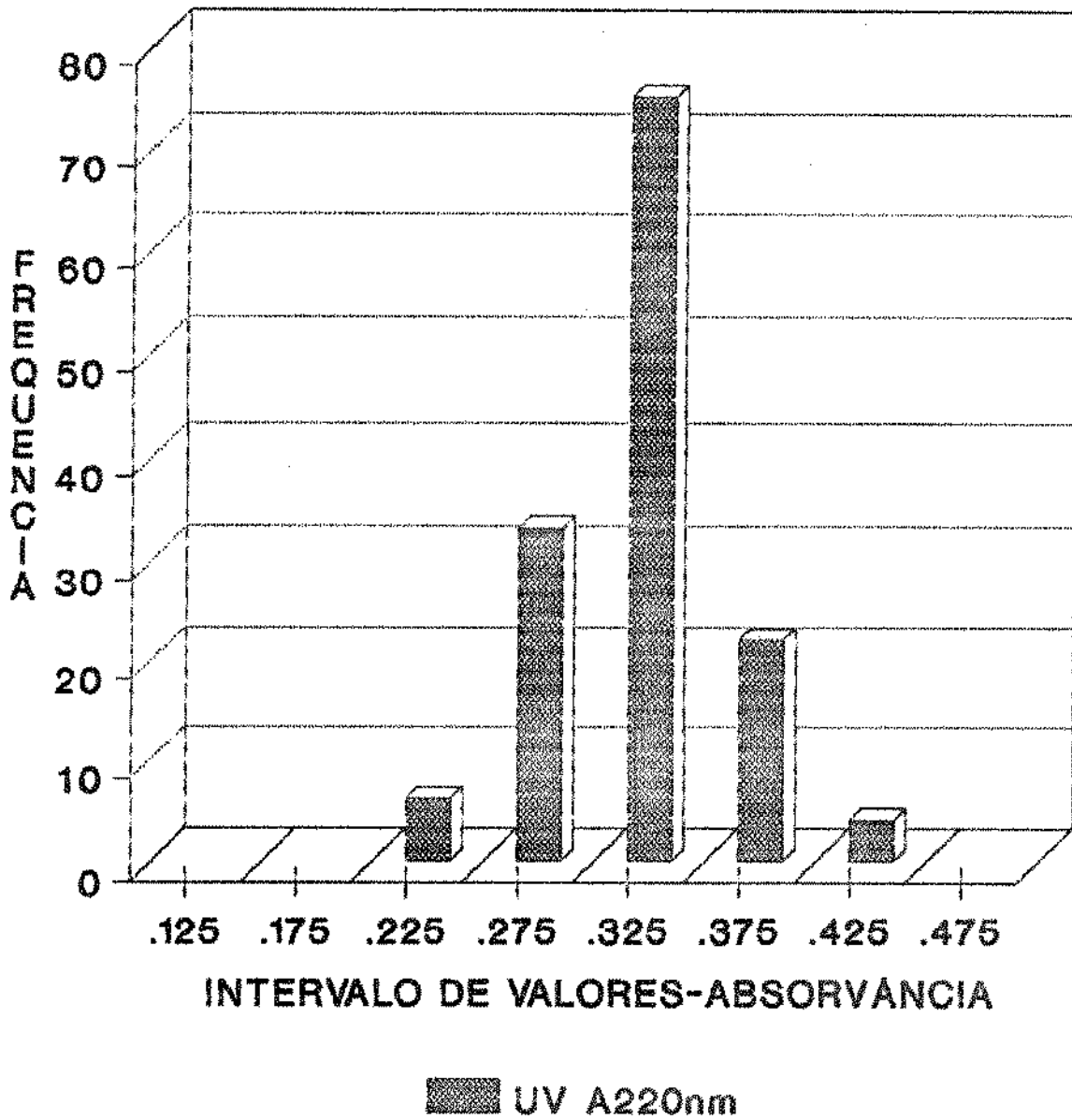


Fig.XII. Correlação entre qualidade microbiológica do leite cru e atividade proteolítica original.



**Fig.XIII.Distribuição de cento e quarenta amostras de leite cru quanto à atividade proteolítica original.**

## 2.2. ESTIMATIVA DA EVOLUÇÃO PROTEOLÍTICA EM QUEIJO TIPO "MINAS FRESVAL" DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA.

Constituindo-se num produto de grande aceitação nas diversas camadas consumidoras e uma tecnologia essencialmente nacional, com origens na produção artesanal que, apesar da industrialização, se mantém em níveis significativos, o queijo tipo "Minas" pareceu um bom modelo para a estimativa da atividade proteolítica pelo método desenvolvido, principalmente na sua variedade fresca), de elevada umidade, não curada e sujeita a grande exsudação ou dessora. Esses aspectos aliados a total carência de estudos e informações no gênero, bem como ao conhecimento das alterações precoces durante o armazenamento e comercialização desse produto, contribuíram para sua escolha.

O experimento foi delineado tanto para a estimativa objetiva da evolução proteolítica, através do método espectrofotométrico a 220 nm, como pelo acompanhamento paralelo através de informações subjetivas decorrentes de variações de aroma ou cheiro, textura, sabor ou gosto e sabor residual, avaliadas num painel de degustação totalmente espontâneo e não sugestivo. Da mesma sub-amostra retirada da estocagem refrigerada para estimativa proteolítica durante todo período de avaliação,



foram retirados pedaços homogêneos e colocados à disposição dos participantes do painel. Antecipadamente esses participantes foram orientados quanto à degustação e às informações decorrentes, de forma totalmente livre porém objetivas quanto aos aspectos avaliados. Contudo, durante a condução do experimento, nenhum elemento foi participativo dos objetivos de tais informações bem como da identidade e idade dos produtos provados, de modo a eliminar qualquer tipo de pré-conceito ou sugestibilidade.

Os queijos, cinco ( 5 ) de produção artesanal e cinco de produção industrial, foram avaliados desde o primeiro dia após a fabricação até o décimo-quinto (15º) dia de estocagem ( duas amostras excepcionalmente até o 21º dia apenas pela estimativa proteolítica), a intervalos variáveis conforme as Figs. XIV e XV. A Fig. XIV refere-se à evolução proteolítica das amostras de queijo de produção artesanal, enquanto a Fig. XV mostra a evolução proteolítica determinada para as amostras de produção industrial.

Observa-se, em ambas as figuras, rápida e intensa evolução proteolítica, excetuando-se apenas duas amostras de produção artesanal. Ao confrontar-se os resultados dessas figuras, dois aspectos chamam atenção. O primeiro diz respeito aos resultados obtidos da estimativa proteolítica no primeiro dia de estocagem. Verifica-se claramente que a produção industrial exibe uma atividade proteolítica inicial muito mais elevada, em média o dobro da estimada para a produção artesanal correspondente. Pode, nesse caso, aventar-se a possibilidade de já haver ocorrido alguma proteólise na matéria-prima antes do processamento industrial, por tratar-se de leite de várias

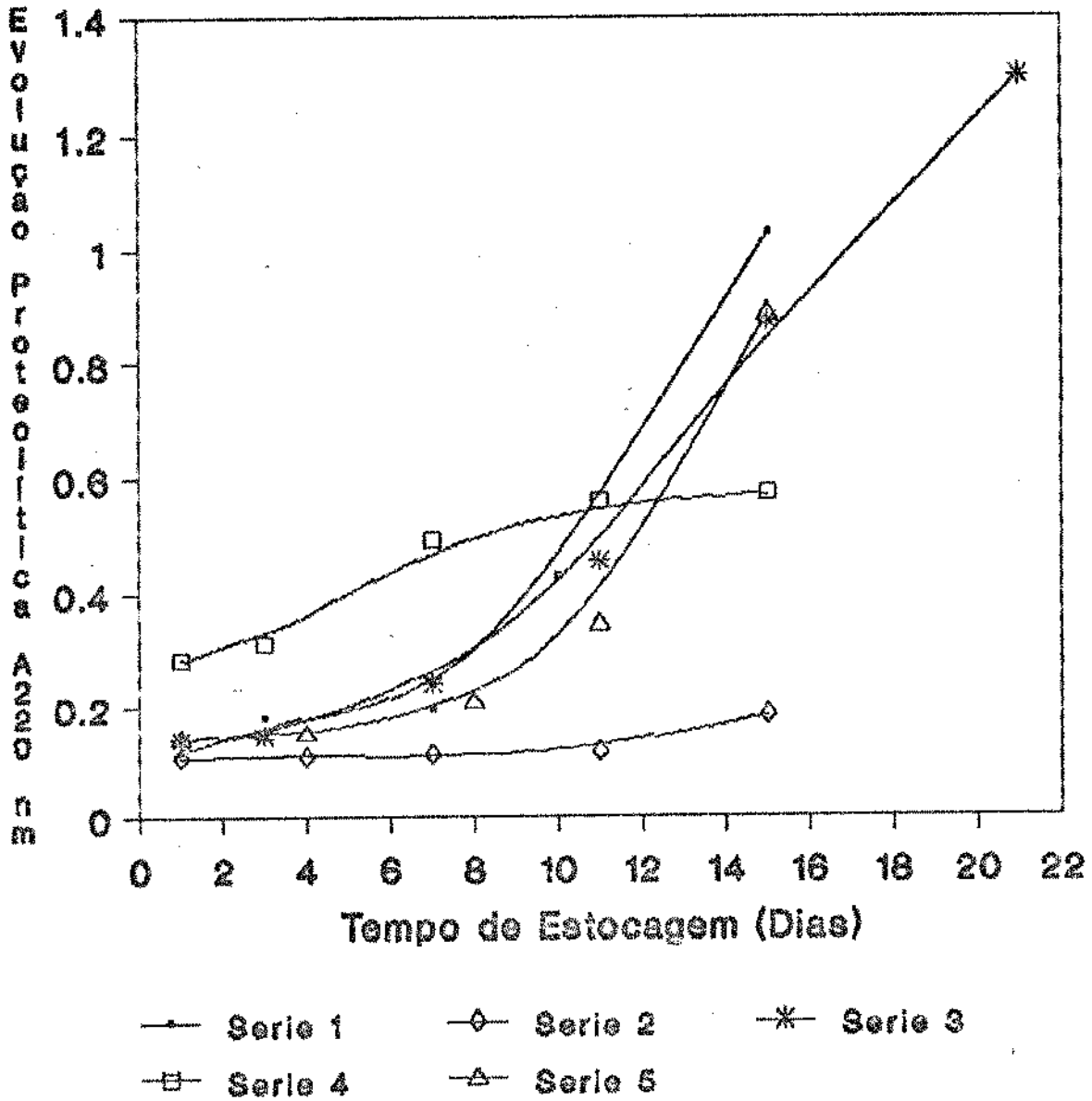


Fig.XIV.Evolução proteolítica de cinco amostras de queijo tipo "Minas Frescal" durante a estocagem a 8°C- P. Artesanal.

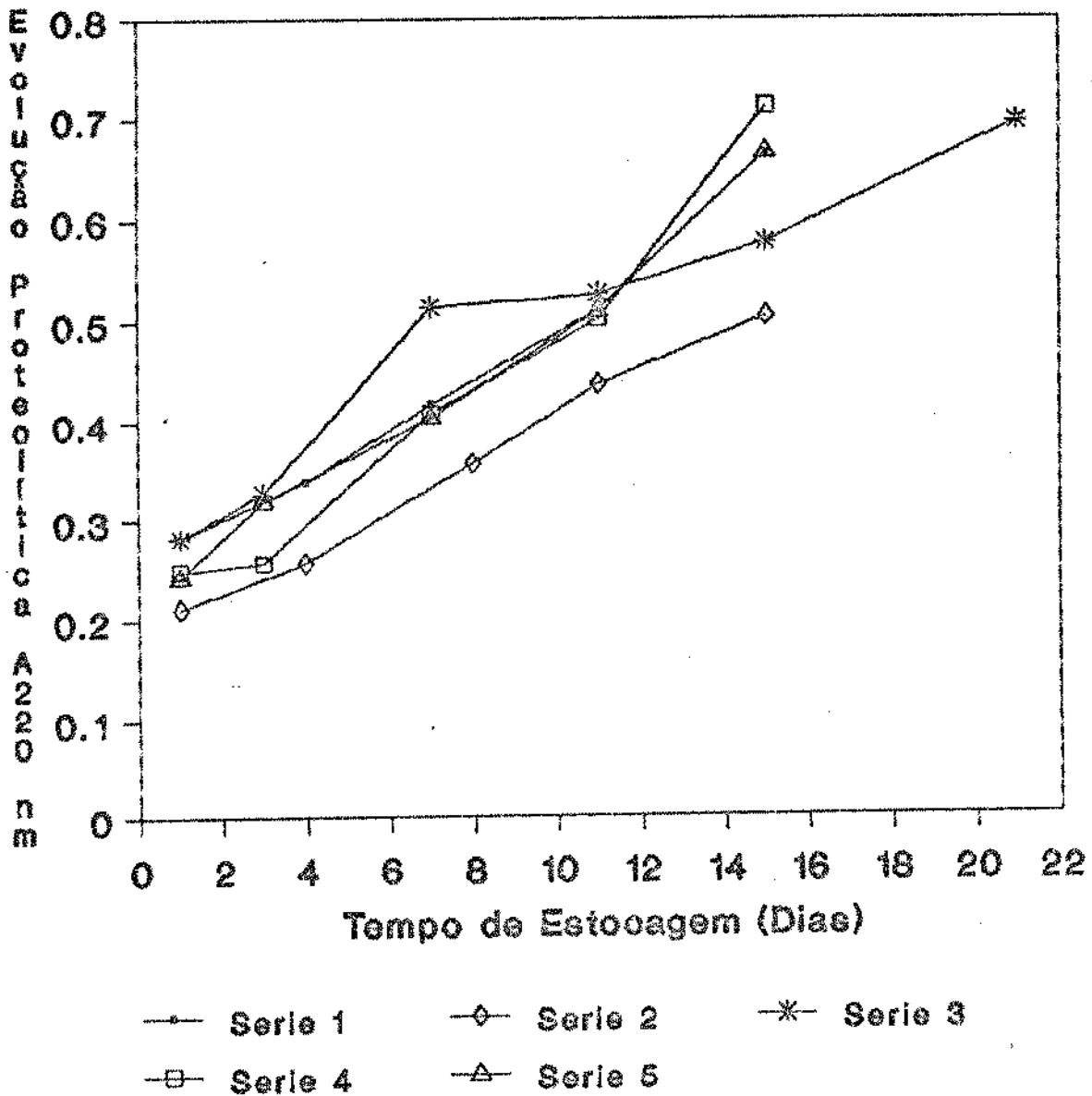


Fig.XV.Evolução proteolítica de cinco amostras de queijo tipo "Minas Freecal", durante a estocagem a 6°C- P.Industrial.

origens e que demora a ingressar nos estabelecimentos industriais. Esse aspecto fundamenta-se ainda mais pelo conhecimento de que os queijos de produção artesanal analisados foram feitos a partir de leite recém-ordenhado, de produção própria do fabricante e única, isto é, sem mistura.

O outro aspecto diz respeito às características da evolução proteolítica determinada. Enquanto para a produção industrial obteve-se uma tendência de evolução crescente e homogênea, para a produção artesanal fica evidente uma "fase de latência", com evolução proteolítica atenuada até aproximadamente o 8º dia de estocagem, para então ingressar num ritmo evolutivo comparado ao anterior, inclusive de forma mais intensa.

Embora constituam-se em observações interessantes, dado aos propósitos originais, cabe verificar que o método desenvolvido prestou-se adequadamente à estimação da evolução proteolítica na totalidade dos casos, monitorando-a de forma objetiva, clara e simples.

Expressando em termos médios, indistintamente para amostras ou origens, constata-se que em relação à determinação do primeiro dia houve um aumento de aproximadamente 300% na absorvância obtida no décimo-quinto (15º) dia de estocagem para os dez ciclos, e de aproximadamente 500% para duas amostras analisadas até o vigésimo-primeiro (21º) dia. É interessante ainda, nessas mesmas circunstâncias, aliar-se a essas evidências os resultados obtidos no painel de experimentação, realizado simultaneamente às determinações da evolução proteolítica. Tais resultados encontram-se sumarizados nas Figs. XVI.a., b., c. e d. A Fig. XVI.a. corresponde à evolução das opiniões quanto ao aroma

ou cheiro dos queijos, a XVI.b. à evolução da textura, a XVI.c. à evolução do sabor ou gosto, e a XVI.d. à evolução do sabor residual, isto é, que permanece na boca após a degustação.

Torna-se necessário enfatizar que os objetivos do painel de degustação foram eleitos no sentido de correlacionar possíveis alterações sensitivas e subjetivas durante a estocagem refrigerada com a estimacão da atividade proteolítica pelo método proposto, sem, contudo, traduzir-se numa análise sensorial com finalidades específicas.

Com tal ressalva, é interessante verificar que, aliada à evolução proteolítica, ocorreram modificações significativas que depreciaram gradativamente as características pesquisadas. Observa-se também que as características mais negativas apareceram ou tornaram-se mais intensas ao redor do 7º ou 8º dia de estocagem que, correlacionada com a estimacão proteolítica, correspondeu à ultrapassagem da absorvância de 0,400 no protocolo utilizado, ou ainda a aproximadamente 36,4 ug de equivalentes de dipeptídio na amostra (amostra = 500uL do dialisado).

Embora não exista um padrão tecnológico definido para esse tipo de queijo, observa-se na Fig. XVI.a. que as opiniões referentes ao aroma ou cheiro dos queijos na primeira e segunda avaliações conferem com a caracterização do produto, com aroma muito suave e levemente ácido. Conclusão semelhante pode ser obtida na Fig. XVI.c., onde se verifica a evolução das opiniões quanto a sabor ou gosto. Praticamente a partir do 7º ou 8º dia de estocagem, correspondendo à terceira avaliação, as opiniões começam a variar mais amplamente, sendo que o aroma passa gradativamente de característico para forte ou desagradável,

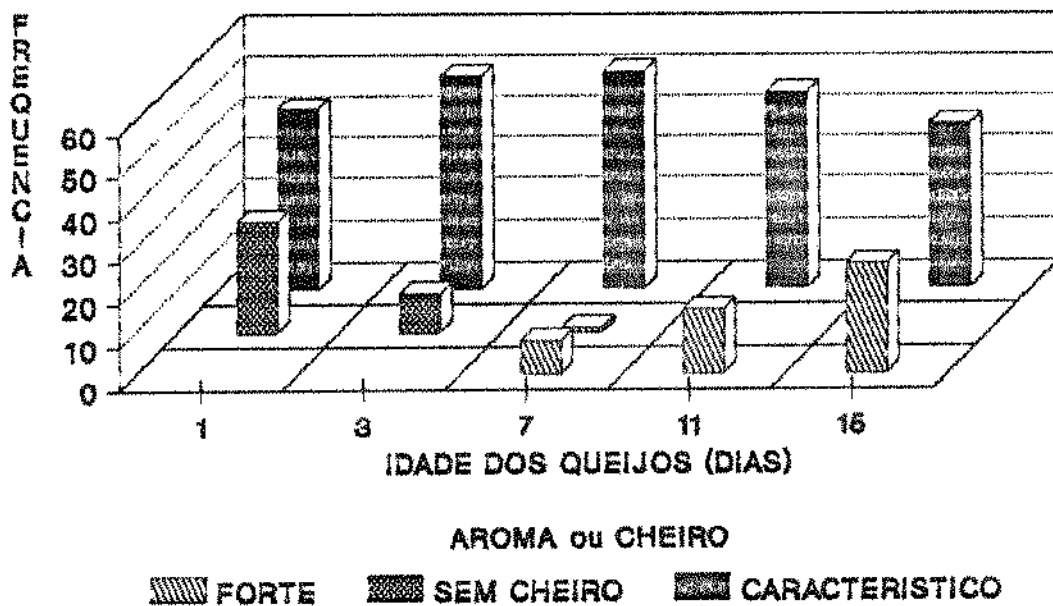


Fig.XVla.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos durante a estocagem refrigerada a 6°C.

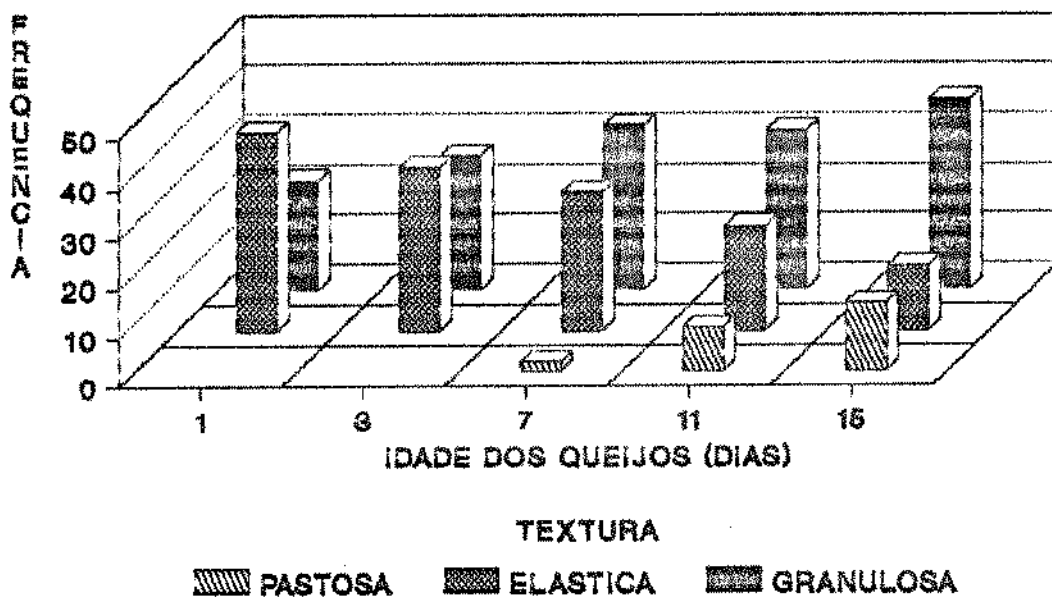


Fig.XVib.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 6°C.

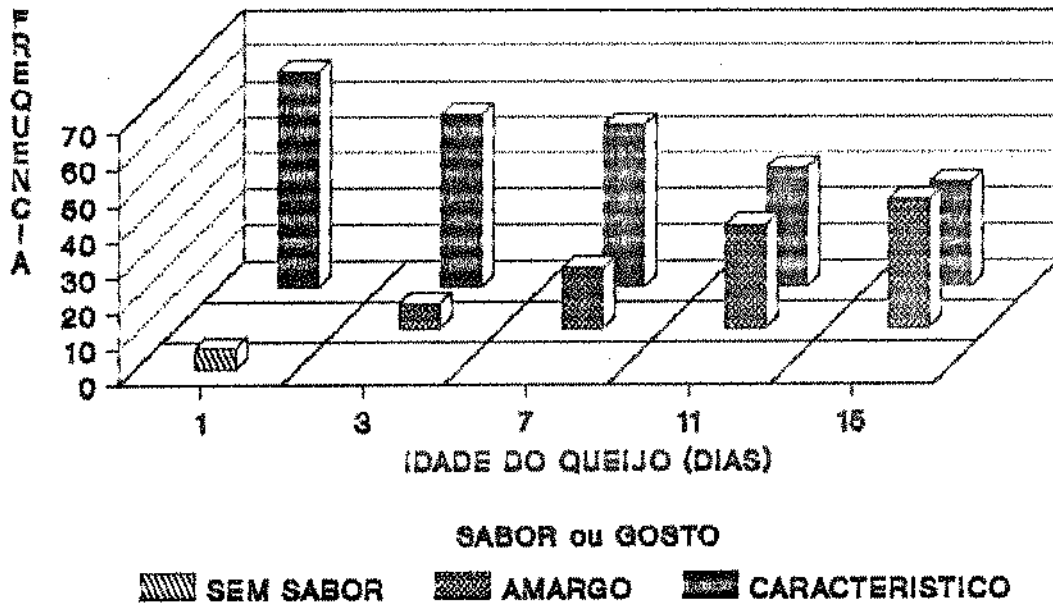


Fig.XVic.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 8°C.

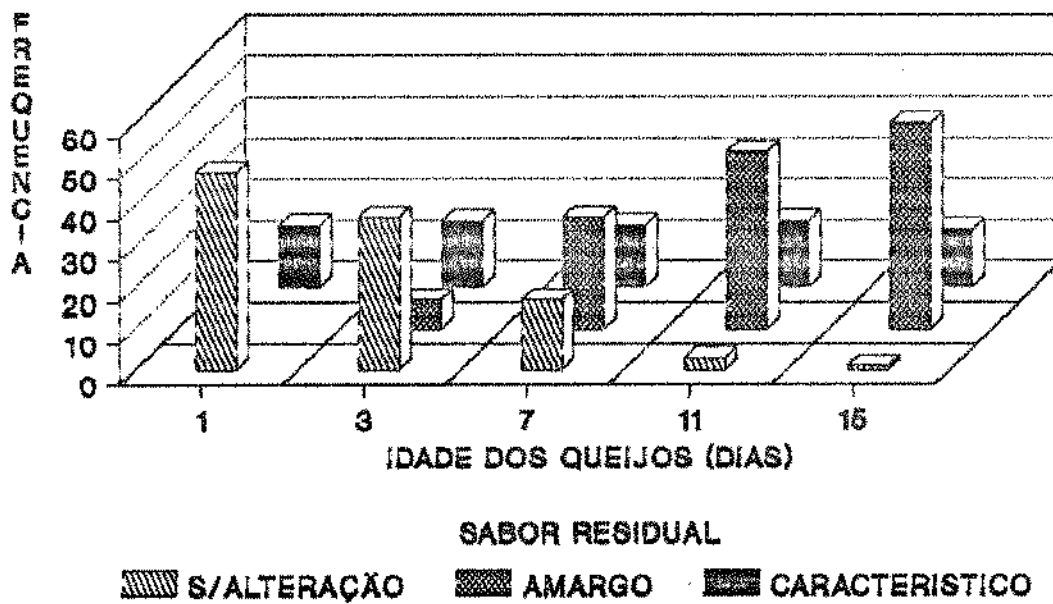


Fig.XVId.Evolução das opiniões no painel de experimentação de queijos, durante a estocagem refrigerada a 8°C.

sendo que no 15º dia essa característica é informada por uma parcela significativa dos provadores. Essencialmente o mesmo ocorre com o sabor, até em maior intensidade.

Para o sabor residual, Fig. XVI.d., observa-se que a característica "amargo" é até mais precoce, aparecendo já no terceiro dia de estocagem e evoluindo significativamente até tornar-se praticamente unânime no 15º dia. Sabe-se que a proteólise contribui para a geração e acumulação de peptídios amargos. Nesse caso, as observações subjetivas se correlacionam muito bem com a evolução proteolítica determinada. Deve-se acrescentar que, dadas as características originalmente suaves desse tipo de queijo e sua elevada umidade, responsável por intensa dessora, torna-se mais fácil a difusão desses possíveis peptídios amargos, bem como a percepção sensorial das alterações pesquisadas.

A Fig. XVI.b. mostra que até a textura, embora mais discretamente, é afetada, passando de elástica a granulosa e mesmo pastosa.

Na ausência de definição tecnológica e mesmo de pesquisas, imagina-se que tais observações aliadas aos resultados da evolução proteolítica possam estimular o surgimento de novas pesquisas que poderiam contribuir para o aperfeiçoamento dessa tecnologia praticamente empírica, possivelmente eliminando problemas que interferem com a durabilidade, aceitação e comercialização desse produto.



### 2.3. ESTIMATIVA DA EVOLUÇÃO PROTEOLÍTICA EM LEITE LONGA-VIDA (UHT), DURANTE A ESTOCAGEM EM TEMPERATURA AMBIENTE.

Conhecidas as características da atividade proteolítica, principalmente quanto à resistência térmica das proteases, sua subsistência e permanência após os tratamentos térmicos convencionais de laticínios (pasteurização e "ultra-high temperature treatment"), percebe-se sua maior importância para leite longa-vida e produtos submetidos a tratamento por UHT, onde, aliado à sobrevivência térmica amplia-se o período de estocagem e comercialização, normalmente à temperatura ambiente. Nesse contexto, e dada sua importância, delineou-se um experimento constituído de cinco ciclos de amostras de leite longa-vida, no qual objetivou-se avaliar o comportamento do método na estimação bem como a evolução proteolítica nesse produto durante a estocagem à temperatura ambiente. As amostras foram adquiridas, identificadas, estocadas e analisadas a intervalos variáveis, desde a análise mais precoce (6<sup>o</sup> dia) até um máximo de 280 dias após a data de fabricação. Os resultados foram sumarizados na Fig.XVII.

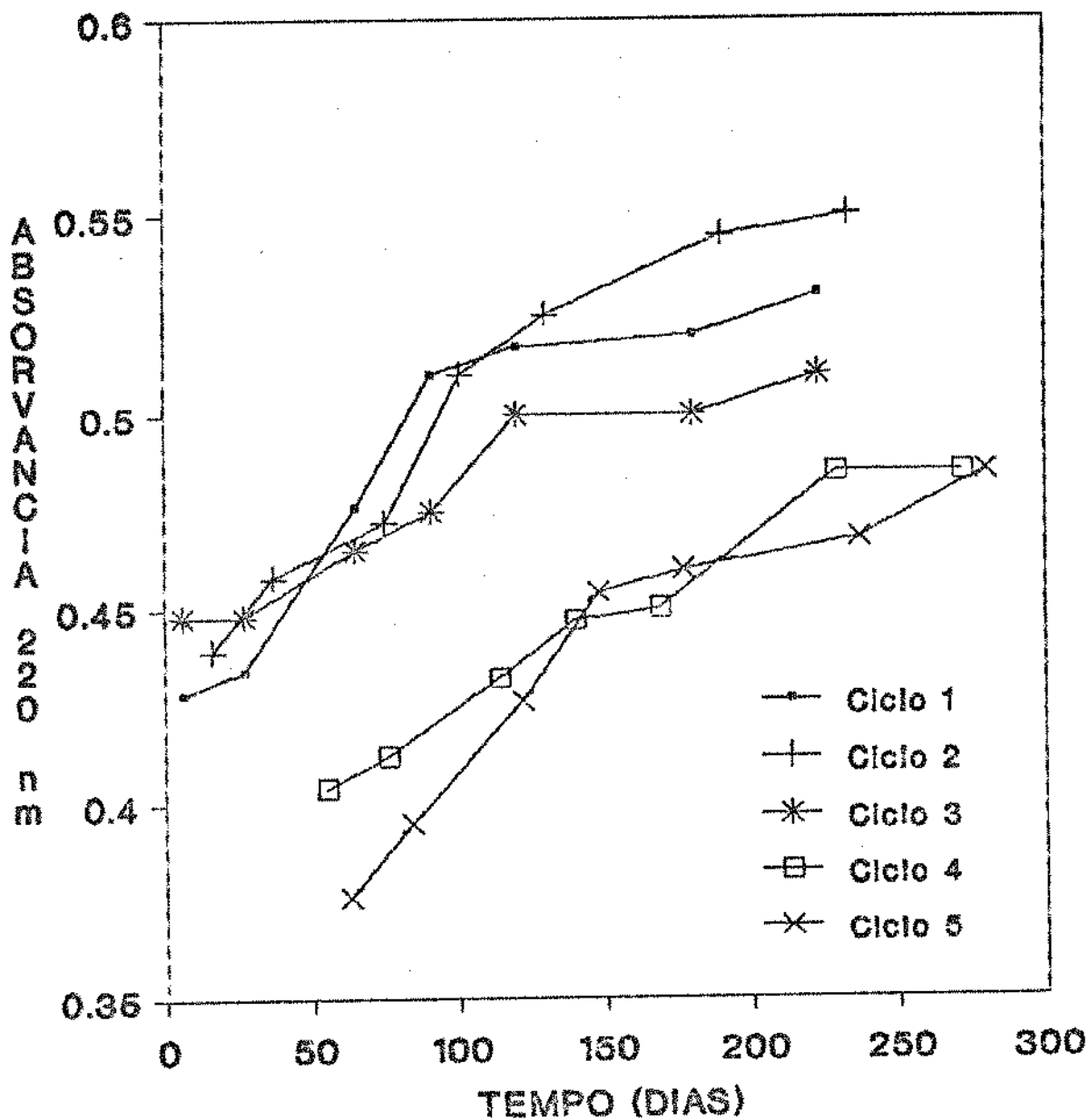


Fig.XVII.Evolução proteolítica de cinco ciclos de leite UHT determinada pelo método UV-220nm, durante a estocagem.

O ciclo 1 refere-se a amostras de leite desnatado (0% de gordura), o ciclo 2 a leite magro (2% de gordura) e os demais (3, 4 e 5) a leite integral. Todas as amostras, embora adquiridas no mercado, pertenciam a uma mesma planta processadora.

Observa-se, em todos os ciclos, que houve uma evolução do "status" proteolítico das amostras ao longo do período de estocagem que foi determinada pelo método proposto, entretanto, essa evolução foi discreta e muito menor que a esperada, principalmente com um período de estocagem tão longo, excedendo em muito ( 120 a 192 dias ) o prazo de validade comercial. De modo geral todos os ciclos seguiram uma mesma tendência evolutiva, caracterizando dois tipos de crescimento, um primeiro de maior intensidade até aproximadamente 120-150 dias de estocagem, e outro após esse período, de menor intensidade de alterações. Coincidentemente esse marco divisório corresponde aproximadamente ao próprio prazo de validade comercial do produto em nosso meio que é de 90 dias.

Todas as amostras se mantiveram aparentemente perfeitas até a última análise, não demonstrando quaisquer alterações, mesmo tanto tempo após o vencimento do prazo de validade. O discreto depósito observado na maioria das amostras quando da primeira análise se manteve inalterado ao longo de todo o período de estocagem. Assim, nada digno de nota foi observado, o que, de certo modo encontra-se de acordo com a discreta evolução proteolítica estimada pelo método.

Comparando-se esses resultados com a média estimada para leite cru observa-se que todas as amostras já iniciam num patamar proteolítico mais elevado, possivelmente denotando a

ocorrência prévia de alguma proteólise.

Ainda, pela análise da Fig. XVII., constata-se que a evolução proteolítica nos primeiros três meses ocorreu de forma mais intensa em leite desnatado (0% de gordura-ciclo 1), seguido de perto pelo leite magro (2% de gordura-ciclo 2), permanecendo os demais em situação mais discreta.

Tanto pela evolução proteolítica determinada, quanto pela ausência de alterações durante o período analisado, pode-se concluir que a proteólise não se constituiu em problema para as amostras examinadas, deixando, entretanto, espaço de grande interesse para pesquisa, no sentido de avaliar as causas dos diferentes comportamentos nas amostras analisadas e possível correlação entre a atividade proteolítica e o aparecimento de problemas de estabilidade tão citados na literatura, embora os mesmos não tenham sido evidenciados neste trabalho.

## CONCLUSÕES

Os vários experimentos configurados no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. A diálise do leite e derivados, objetivando a estimacão da atividade proteolítica no dialisado, pode ser realizada indistintamente em membrana de acetato de celulose importada (sacos de diálise) ou nacional (envoltório industrial utilizado em embutidos), desde que tomadas as devidas precauções.

2. Os fragmentos protéicos oriundos da proteólise (oligopeptídios) são dialisáveis através da membrana de acetato de celulose, de modo semelhante ao evidenciado para aminoácidos como a tirosina, permitindo a substituição da precipitação com TCA (Ácido Tricloroacético) e sua estimacão ou quantificacão por métodos apropriados no dialisado.

3. Os oligopeptídios dialisados apresentam a mesma absortividade característica da ligacão peptídica (das proteínas e peptídios) na região ultravioleta entre 200-230 nm, o que tornou possível o desenvolvimento e padronizacão de método espectrofotométrico nessa região do espectro, para sua estimativa ou quantificacão.

4. O método assim desenvolvido, quando comparado ao de Hull, mostrou-se mais adequado e com maior sensibilidade para a estimação da proteólise em leite e derivados. Enquanto no método de Hull a absorvidade determinada para a própria tirosina foi de aproximadamente 2,00, a absorvidade determinada para o dipeptídeo Glicil-L-prolina foi de 10,90 a 220 nm, 16,00 a 215 nm e 21,00 a 210 nm. Esses valores se mostram muito próximos e praticamente invariáveis para várias proteínas e para com os valores observados na literatura, caracterizando uma sensibilidade muito superior à do método de Hull.

5. Aliada a essa sensibilidade, o método conserva as características anteriormente aventadas por MISTRY & KOSIKOWSKI quando da utilização da diálise para o método de Hull, isto é, constitui-se num método fácil, rápido e barato.

6. O aparecimento e evolução de características indesejáveis em queijo "Minas Frescal" correlacionou-se muito bem com a evolução proteolítica determinada pelo método desenvolvido, como por exemplo o incremento do sabor amargo residual, possivelmente oriundo da formação e acumulação de peptídeos amargos.

7. A aplicação do método à estimativa da evolução proteolítica em leite longa-vida (UHT) mostrou-se também adequada, embora as amostras analisadas tenham apresentado evolução proteolítica muito discreta, mesmo com um período de

estocagem de até 280 dias em temperatura ambiente.

8. O método desenvolvido pode ter sua sensibilidade melhorada em muito pela utilização de comprimentos de onda mais baixos (205-210 nm), o que não foi possível explorar no presente trabalho, devida à limitação do espectrofotômetro utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T. & SPECK, M.L. 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. J. Dairy Sci., 58:828.
- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T. & SPECK, M.L. 1976. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on the milk proteins and stability to UHT-treatment. J. Dairy Sci., 59:823.
- ALAIS, C. 1975. Science du lait. Principes des techniques laitières, 3 edn., p. 221. Paris. Ed. Sepsac.
- ANDREWS, A.T. 1979. The formation and structure of some proteose-peptone components. J. Dairy Research, 46:215.
- ANDREWS, A.T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. J. Dairy Research, 50:45.
- ANDREWS, A.T. & ALICHANIDIS, E. 1983. Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. J. Dairy Research, 50:275
- BEAVEN, G.H. & HOLIDAY, E.R. 1952. Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. Advances in protein chemistry, 7:319.
- BELOFF, A. & ANFINSEN, C.B. 1948. The products of proteolysis of some purified proteins. J. Biol. Chem., 176:863.
- BENDIXEN, G. 1957. Quantitative determination of protein in serum and cerebrospinal fluid. Nord. Med., 58:1487.
- BIRKELAND, S.E.; STEPANIAK, L. & SØRHAUG, T. 1985. Quantitative studies of heat stable proteinase from P. fluorescens P1 by the enzyme-linked immunosorbent assay. Applied and Environmental Microbiology, 49:382.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochem., 72:248.
- BUCKY, A.R.; HAYES, P.R. & ROBINSON, D.S. 1988. Enhanced inactivation of bacterial lipases and proteases in whole milk by a modified ultra high temperature treatment. J. Dairy Research, 55:373.



- CASTELL, J.V.; CERVERA, M. & MARCO, R. 1979. A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A reexamination of the conditions of reaction. Anal. Biochem., 99:379.
- CHRISTEN, G.L.; WEL-CHUN, W. & TYN-JENQ, R. 1986. Comparison of the heat resistance of bacterial lipases and proteases and the effect on ultra high temperature milk quality. J. Dairy Sci., 69:2769.
- CLIFFE, A.J. & LAW, B.A. 1982. A new method for the detections of microbial proteolytic enzymes in milk. J. Dairy Research, 49:209.
- CHEN, J.H. & LEDFORD, R.A. 1971. Purification and characterization of milk protease. J. Dairy Sci., 54:763.
- CHISM, G.W.; HUANG, A.E. & MARSHALL, J.A. 1979. Sensitive assay for proteases in sterile milk. J. Dairy Sci., 62:1798.
- CHURCH, F.C.; SWAISGOAD, H.E.; PORTER, D.H. & CATIGNANI, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci., 66:1219.
- CORRADINI, C. & PANINI-PECIS, P. 1979. J. Dairy Research, 46:227. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- COUSIN, M.A. & MARTH, E.H. 1977. J. Dairy Sci., 60:1048. Apud: FAIRNBAIRN D.J. & LAW, B.A. 1986.
- COUSIN, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. A review. J. Food Protection, 45:172.
- COUSINS, C.M.; SHARPE, M.E. & LAW, B.A. 1977. The bacteriological quality of milk for Cheddar cheesemaking. Dairy Industries International, 42(7):12.
- CRAIG, L.C. & KING, T.P. 1966. Dialysis. In: Methods of Biochemical Analysis. Vol. X. David Glick - Interscience Publ. 2nd. Ed., NY.
- DAVIS, N.C. & SMITH, E.L. 1967. Assay of proteolytic Enzymes. In: Methods of Biochemical Analysis. Vol. II. David Glick Interscience Publ. NY.
- de RHAM, D. & ANDREWS, A.T. 1982. The roles of native milk proteinase and its zymogen during proteolysis in normal bovine milk. J. Dairy Research, 49:577.
- DIERMAYR, P.; KROLL, S. & KLOSTERMEYER, H. 1987. Mechanisms of heat inactivation of a proteinase from *Ps. fluorescens* biotype I\*. J. Dairy Research, 54:51.

- DRIESSEN, F.M. 1976. Proteolysis in UHT-sterilized milk and milk products. Zuivelzucht, 68:514.
- DRIESSEN, F.M. 1981. Relationship between growth of Gram-negative rods in milk and their production of proteinases. Netherlands Milk and Dairy J., 35:344.
- DRIESSEN, F.M. 1989. Inactivation of lipases & proteinases (indigenous & bacterial). In: Bulletin of the IDF, 238:71.
- EDDY, B.P. 1960. The use and meaning of the term "psychrophilic". J. Applied Bacteriology, 23:189.
- EIGEL, W.N. 1977. Formation of  $\gamma_1$ -A<sup>2</sup>,  $\gamma_2$ -A<sup>2</sup> and  $\gamma_3$ -A caseins by in vitro proteolysis of beta-casein A<sup>2</sup> with bovine plasmin. Intern. J. of Biochem., 8:187.
- EIGEL, W.N., BUTLER, J.E., ERNSTROM, C.A., FARREL JR., H.M., HARWALKAR, V.R., JENNESS, R. & WHITNEY, R. McL. 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: fifth revision. J. Dairy Sci., 67:1599.
- EXTERKATE, F.A. 1975. An introductory study of the proteolytic system of Streptococcus cremoris strain HP. Netherlands Milk and Dairy J., 29:303.
- FAIRBAIRN, D.J. & LAW, B.A. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. J. Dairy Research, 53:139.
- FOX, P.F. & HEARNE, C.M. 1978. Heat stability of milk: influence of dilution and dialysis against water. J. Dairy Research, 45:149.
- FUJII, S. & NAKAI, S. 1980. Optimization of data transformation for linearization. Can. Inst. Food Sci. Technol., 13:188.
- GEBRE-EGZIABHER, A.; HUMBERT, E.S. & BLANKENAGEL, G. 1980. Heat stable proteases from psychrotrophic bacteria in milk. J. Food Protection, 43:197.
- GED J. & ALAIS, C. 1976. Activité protéasique persistant dans les laits stérilisés. Le Lait, 56:645.
- GEHRIGER, G. 1980. Multiplication of bacteria in milk during farm storage. In: Factors affecting the bacteriological quality of raw milk. IDF. Doc.N 120. Chapter 5:22.
- GOLDFARB, A.R.; SAIDEL, L.J. & MOSOVICH, E. 1951. The ultraviolet absorption spectra of proteins. J. Biol. Chem., 193:397.
- GORDON, W.G. & GROVES, M.L. 1975. Primary sequence of beta, gamma and minor caseins. J. Dairy Sci., 58:574.
- GRIEVE, P.A. & KITCHEN, M.L. 1985. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural

- milk proteinases on caseins. J. Dairy Research 51:102.
- GRUFFERTY, M.B. & FOX, P.F. 1988. Review Article. Milk alkaline proteinase. J. Dairy Research, 55:609.
- GUTHY, K., YOUN-HO-HONG & KLOSTERMEYER, H. 1985. Food Microstructure Congress, Las Vegas, USA. Apud: RENNER, E. 1988.
- HERMIER, J. 1965. Spore germination in Bacillus subtilis. III. Demonstration of an alanine dehydrogenase and a leucine dehydrogenase in extracts of the spores. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 5(4):483.
- HESTRIN, S., AVINERI-SHAPIRO, S. & ASCHNER, M. 1943. The enzymic production of levan. Biochem. J., 37:450.
- HOFMANN, C.J., KEENAN, T.W. & EIGEL, W.N. 1979. Association of plasminogen with bovine milk fat globule membrane. International J. of Biochem., 10:909.
- HULL, M.E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. J. Dairy Sci., 30:881.
- HUMBERT, G. & ALAIS, C. 1979. Review of progress of dairy science: The milk proteinase system. J. Dairy Research, 46:559.
- IGARASHI, Y. 1989. A method for determination of gamma-casein and its use for investigating proteolysis in bovine milk. J. Dairy Research, 56:619.
- IWAIDA, M.; KAWAGUCHI, Y. & TSUGO, T. 1967. Ultraviolet spectrophotometric determination of protein of milk. J. Dairy Sci., 50(8):1322-1327.
- JANZEN, J.J.; BISHOPP, J.R. & BODINE, A.B. 1982. Relationship of protease activity to shelf-life of skim and whole milk. J. Dairy Sci., 65:2237.
- JOST, R., MONTI, J.C. & HIDALGO, J. 1976. J. of Dairy Sci., 59:1568. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- JUFFS, H.S. 1973. Proteolysis detection in milk. I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. J. Dairy Research, 40:371.
- JUFFS, H.S. 1973. Proteolysis detection in milk. II. The effect of preincubation of raw and laboratory pasteurized bulk milk samples on Tyrosine value and its relationship with bacterial populations. J. Dairy Research, 40:303.
- KHALFAN, H., ABUKNESHA, R. & ROBINSON, D. 1983. Biochem. J., 209:265. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.

- KINDOSHITA, K., MAEDA, H. & HINUMA, Y. 1980. Annal. Biochem., 104:15. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- KISHONTI, E. 1975. Influence of heat resistant lipases and proteases in psychrotrophic bacteria on product quality. IDF Bull. Doc., 86:121.
- KOSIKOWSKI, F.V. 1964. Dialysis phosphatase method for milk and all dairy products. J. Dairy Sci., 47:748.
- KIRSCHENBAUM, D.M. 1984. Molar absorptivity and  $A_{1\%}^{1\text{cm}}$  values for proteins at selected wavelengths of the visible and UV-regions. XXIII. Appl. Biochem. Biotechnol., 9(2):187.
- KROLL, S. & KLOSTERMEYER, H. 1984. Proteolytic activity of P. fluorescens in milk: determination with azocasein as compared with HPA. Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und Forschung, 178:179.
- KUAYE, A.Y. 1989. Um novo método espectrofotométrico UV para dosagem de proteínas do leite em meio alcalino. Bol. SBCTA, Campinas, 23(3/4):179.
- KUNITZ, M. 1974. J. Dairy Physiol., 30:391. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- KWAN, K.K.H.; NAKAI, S. & SKURA, B.J. 1983. Comparison of four methods for determining protease activity in milk. J. Food Sci., 48:1418.
- LABORDE, J.B.; TULLIS, D.L.; YOUNG, J.F. & HOLSON, J.F. 1979. Measurement of protein in serum and rodent embryos by spectrophotometry at 215 and 225 nm. Microchemical Journal, 24:275.
- LAW, B.A. & ANDREWS, A.T. 1984. Comunicação pessoal a MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- LAW, B.A.; ANDREWS, A.T. & SHARPE, M.E. 1977. Gelation of ultra high temperature sterilized milk by proteases of a strain of Ps. fluorescens isolated from raw milk. J. Dairy Research, 44:145.
- LAW, B.A. 1979. Review of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. J. Dairy Research, 46:573.
- LEHNINGER, A.L. 1976. Bioquímica. Vol.1. Componentes moleculares das células. 3ª Reimp. (1980). Editora Edgard Blucher Ltda.
- LIN, T., MEANS, G. & FEENEY, R. 1969. J. Biol. Chem., 249:787. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- LOWRY, D.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.I. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265.

- MANJI, B.; KAKUDA, Y. & ARNOTT, D.R. 1986. Effect of storage temperature on age-galation of UHT milk processed by direct and indirect heating systems. J. Dairy Sci., 69: 2994.
- MAYERHOFER, H.J.; MARSHALL, R.T.; WHITE, C.H. & LI, M. 1973. Characterization of a heat stable protease of Pseudomonas fluorescens P26. Applied Microbiology, 25:44.
- McKELLAR, R.C. 1981. Development of off-flavours in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. J. Dairy Sci., 64:2138.
- McKELLAR, R.C. 1982. Factors influencing the production of extra cellular proteinase by Ps. fluorescens. J. Applied Bacteriology, 53:305.
- McKELLAR, R.C. 1984. Comparison of the Hide Powder Azure and Casein-trinitrobenzene sulfonic acid methods for determining proteolysis in skim milk. J. Food Protection, 47:476.
- MISTRY, V.V. & KOSIKOWSKI, F.V. 1983. Application of dialysis to measure protease activity in milk. J. Dairy Sci., 66:687.
- MITCHELL, G.E.; SYMONS, M.H. & EWINGS, K.N. 1989. Quantification of bacterial proteolysis in milk --- Effects of added and secreted protease in pasteurized milk. The Australian J. of Dairy Technol., November, :70.
- MOL, H. & VINCENTIE, H.M. 1981. In: Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity, p. 97-108. Ed. ROBERTS, T.A., HOBBS, G., CHRISTIAN, J.H.B. & SKOVGAARD, N. New York: Academic Press.
- MOORE, S. 1968. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. J. Biol. Chemistry, 243:6281.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem., 176: 367.
- MOORE, S. & STEIN, W.H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem., 211:907.
- MOTTAR, J. 1981. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. Milchwissenschaft, 36:87.
- MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987. Methods for the determination of the activity of indigenous and bacterial proteinases in milk & milk products. A review. Bulletin of IDF, 209:Chapter 3:41.

- MOTTAR, J., WAES, G., MOERMANS, R. & NAUDTS, M. 1979. Milchwiss., 34:257. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- MURPHY, J.B. & KIES, M.W. 1960. Note on spectrophotometric determination of proteins in dilute solutions. Biochem. Biophys. Acta, 45:382.
- NOOMEN, A. 1975. Proteolytic activity of milk protease in raw and pasteurized cow's milk. Netherlands Milk and Dairy J., 29:153.
- NOREAU, J. & DRAPEAU, G.R. 1979. Isolation and properties of the protease from the wild-type and mutant strains of Pseudomonas fragi. J. Bact., 140:911.
- NURMIKKO, V. 1957. Microbiological determination of vitamins and amino acid produced by microorganisms using the dialysis cell. Applied Microbiol., 5:160.
- PEARCE, R.J. 1989. Thermal denaturation of whey protein. Bulletin of the IDF, 238:17.
- PÉLISSIER, J.P. 1984. Protéolyse des caséines. Sci. des Aliments, 4(1):2.
- PETERSON, G.L. 1979. Review. Reviw of the Folin Phenol protein quantitation method of LOWRY, ROSEBROUGH, FARR and RANDALL. Analytical Bioch., 100:201.
- PIERZCHALA, P.A., MILLIERE, J.B. & ZIMMERMAN, M. 1979. Bioch. J., 183:555. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- POLYCHRONIADDOU, A. 1988. A simple procedure using trinitrobenzene sulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese. J. Dairy Research, 55:585.
- REICHARDT, W. & DROESE, B. 1982. Quantitative estimation of protein content of milk by means of ultraviolet spectrophotometry. Die Nahrung, 26(6):519.
- REIMERDES, E.H. 1982. Changes in the proteins of raw milk during storage. In: Developments in Dairy Chemistry - 1. Proteins. P. 271-288. London: Applied Science Publishers.
- REIMERDES, E.H. 1983. New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk. J. Dairy Sci., 66:1591.
- REIMERDES, E.H. & KLOSTERMEYER, H. 1976. Determination of proteolytic activities on casein substrates. Methods in Enzymology, 45:26.
- REITER, B.; SOROKIN, Y.; PICKERING, A. & HALL, A.J. 1969. Hydrolysis of fat and protein in small cheese made under aseptic conditions. J. Dairy Research, 36:65.
- RENNER, E. 1988. Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at high

- ambient temperatures. J. Dairy Research, 55:125.
- REYNOLDS, J.A. & TANFORD, C. 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 66(3):1002.
- RICHTER, R.L.; SCHIMIDT, R.H.; SMITH, K.L.; MULL, L.E. & HENRY, S.L. 1979. Proteolytic activity in ultrapasteurized, aseptically packaged whipping cream. J. Food Protection, 42:43.
- RICHTER, R. 1981. Microbiological problems in dairy foods in the 1980's. J. Food Protection, 44:471.
- SAIDEL, L.J.; GOLDFARB, A.R. & WALDMAN, S. 1952. J. Biol. Chem., 197:285. Apud: WETLAUFER, D.B. 1962.
- SAMPLES, D.R.; RICHTER, R.L. & DILL, C.W. 1984. Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: comparison of Hull and Trinitrobenzene sulfonic acid procedures. J. Dairy Sci., 67:60.
- SCHWABE, C. 1973. A fluorescent assay for proteolytic enzymes. Anal. Biochem., 53:484.
- SCOPES, R.K. 1974. Measurement of protein by spectrophotometry at 205nm. Analytical Biochem., 59:277.
- SCOPES, R. 1982. Protein Purification. Principles and Practice: 241-243. Springer-Verlag. New York. Ed. Charles R. Cantor.
- SENYK, G.F.; SHIPE, W.F.; LEDFORD, R.A. & KOTSIDES, E. 1982. J. Dairy Sci., 65(Suppl. 1):54. Apud: FAIRNBAIEN, D.J. & LAW, B.A. 1986.
- SHAMSUZZMAN, K. & McKELLAR, R. 1987. Peptidases from two strains of *Ps. fluorescens*: partial purification, properties and action on milk. J. Dairy Research, 54:283.
- SHEHATA, T.E. & COLLINS, E.B. 1971. Applied Microbiology, 21:466. Apud: LAW, B.A. 1979.
- SHIPE, W.F., SENIK, G.F., LEDFORD, R.A., BANDLER, D.K. & WOLFF, E.T. 1980. Flavor and chemical evaluation of fresh and aged market milk. J. Dairy Sci., 63(Suppl. 1):43.
- SHIPE, W.F., SENIK, G.F., LEDFORD, R.A., BANDLER, D.K. & WOLFF, E.T. 1981. Changes in flavor, acid degree value, tyrosine value and pyruvate content of commercial milks during storage. J. Dairy Sci., 64(Suppl. 1):46.
- SINGH, H. & FOX, P.F. 1989. Heat induced changes in casein. Bulletin of the IDF, 238:24.
- SPECTOR, T. 1978. Refinement of the Coomassie Blue Method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for 0,5 to 50 ug of protein. Anal. Biochem., 86:142.

- STEAD, D. 1987-a. Production of extra cellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in milk. J. Dairy Research, 54:535.
- STEAD, D. 1987-b. Assay of proteinases of psychrotrophic bacteria in milk using Hide Powder Azure and a simple procedure for clarification of milk. J. Dairy Research, 54:295.
- STEPANIAK, L.; FOX, P.F. & DALY, C. 1982. Isolation and general characterization of heat stable proteinase from *Ps. fluorescens* AFT. 36. Biochem. Biophys. Acta., 717:376.
- STREULLI, C.A. & AVERELL, P.R. 1970. The analytical chemistry of nitrogen and its compounds. In: Chemical Analysis, Vol.20. Wiley Interscience. USA.
- TAYFOUR, A., MILLIERE, J.B. & VEILLET-PONCET, L. 1982. Milchwiss. 37:720. Apud: MOTTAR, J. & DRIESSEN, F.M. 1987.
- THOMAS, S.B. 1974. The microflora of bulk collected milk. Dairy Industries, Part 1. July:237; Part 2. August:279.
- TOMBS, M.P.; SOUTER, F. & MACLAGAN, N.F. 1969. The spectrophotometric determination of protein at 210 nm. Biochem. J., 73:167.
- TORRIE, J.P.; CHOLETTE, H.; FROERLICH, D.A. & McKELLAR, R.C. 1983. Growth of an extracellular proteinase deficient strain of *Ps. fluorescens* on milk and milk proteins. J. Dairy Research, 50:365.
- VENKESH, R.H.; BOUTIN-MUMA, B.; CHOLETTE, H.; McKELLAR, R.C. & EMMONS, D.B. 1989. Isolation and partial purification of astringent compounds from ultra high temperature sterilized milk. J. Dairy Research, 56:367.
- VILELLA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. 1973. Técnicas e experimentos de bioquímica. Guanabara-Koogan. Brasil.
- VINET, G. & FREDETTE, V. 1951. Apparatus for the culture of bacteria in cellophane tubes. Science, 114:549.
- WADDELL, W.J. & HILL, 1956. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. J. Lab. Clin. Med., 48 (August):311.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. 1941. Isolierung und kristallisation des Gärungsferments enolase. Biochem. Z., 310:384.
- WASHAM, C.J.; OLSON, H.C. & VEDAMUTHU, E.T. 1977. Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurized milk. J. Food Protection, 40:101.
- WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H. & ALFORD, J.A. 1978. Fundamentals of Dairy Chemistry, 2nd. Ed. The AVI Publishing Company, Inc.



Westport, Connecticut.

WEBSTER, G.C. 1970. Comparison of direct spectrophotometric methods for the measurement of protein concentration. Biochem. Biophys. Acta, 207:371.

WETLAUFER, D.B. 1962. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. Advances in protein chemistry, 27:303.

WHITAKER, J.R. 1972. Principles of Enzymology for the Food Sciences. Chapter 3. Enzyme Purification ( 65-121 ). Marcel Dekker, Inc. New York and Basel.

WHITAKER, J.R. & GRANUM, P.E. 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280nm. Analytical Bioch., 109:156.