

CONSERVABILIDADE DE LEITE CRU À 20°C PELA ATIVAÇÃO DA LACTOPEROXIDASE E ADIÇÃO DE TIOCIANATO DE SÓDIO

KROLOW, Ana C.R. & FAGUNDES, Celso M.

UFPEL/FAEM – Deptº Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Campus Universitário – Caixa Postal, 354
CEP 96010-900 – Tel. (0532) 757258 – Pelotas/RS - Brasil
(Recebido para publicação em 23/11/95)

RESUMO

Avaliou-se o tempo de conservação de leite cru à temperatura de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), após ativação do sistema lactoperoxidase, utilizando peróxido de hidrogênio entre 4 e 60mg.L⁻¹ e adicionando 12mg.L⁻¹ de tiocianato de sódio. A ação conservante do hipotiocianato foi avaliada através da acidez titulável, estabilidade ao álcool e pH em leite cru, previamente mantido sob refrigeração (12 h), após a ordenha. O sistema lactoperoxidase ativada proporcionou um tempo de conservação do leite cru por 8 horas com adições de 8 a 40mg.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. O controle (ação isolada de peróxido de hidrogênio) alcançou o mesmo tempo de conservação na concentração de 16mg.L⁻¹. Os resultados confirmam a possibilidade de diminuir a concentração do peróxido de hidrogênio, utilizando o tiocianato, na conservação do leite cru à temperatura ambiente.

Palavras-chave: leite cru, lactoperoxidase, tiocianato de sódio, peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

PRESERVATION TIME OF RAW MILK AT 20°C BY ACTIVATION OF LACTOPEROXIDASE SYSTEM AND USING SODIUM THIOCYANATE. The preservation time of raw milk was evaluated at 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) by activation of lactoperoxidase system, using the hydrogen peroxide (4-60mg.L⁻¹) and the sodium thiocyanate (12mg.L⁻¹). The preservation activity of hypotiocyanate was verified by the titratable acidity, alcohol stability and pH on raw whole milk, which was stored at moderately cold, during 12 hours, after milking cows. The lactoperoxidase system with addition of thiocyanate increased the milk preservation time during 8 hour, using 8mg.L⁻¹ of hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide, as antibacterian agent (control) needs 16mg.L⁻¹ for the same time of milk conservation. This result confirm the possibility of decreasing on hydrogen peroxide concentration with thiocyanate on preservation of raw milk at environmental temperature.

Key-words: raw milk, lactoperoxidase, sodium thiocyanate, hydrogen peroxide.

INTRODUÇÃO

O leite, alimento fundamental na dieta humana, necessita de adequada higiene e conservação em todas as etapas envolvidas, desde obtenção, transporte, processamento, comercialização e consumo, tendo em vista sua alta perecibilidade (BUSANI, 1989).

No Brasil, práticas inadequadas de produção e manuseio do leite nas propriedades, elevada temperatura ambiente, enorme distância entre a propriedade e o local de processamento, entre outras, tornam o leite de baixa qualidade (ROSSI, 1992).

O sistema ideal de conservação do leite é a refrigeração, entretanto, soluções desse tipo nem sempre são viáveis, por razões de ordem técnica e econômica (ROSSI, 1994).

Há, entretanto, proteínas no leite que tem atividade bactericida e/ou bacteriostática, as quais fazem parte de um sistema de inibição natural. Genericamente denominadas lacteninas, entre elas encontram-se: complemento C, anticorpos, lisosimas, lactoferrinas, lactoperoxidases, etc. (SANTOS, 1985).

O peróxido de hidrogênio no leite cru, após ação da peroxidase, promove a oxidação do tiocianato (componente natural do leite) em hipotiocianato que tem efeito antibacteriano, principalmente em bacterias Gram+ (AUNE & THOMAS, 1977; PRUITT et alii, 1982), prolongando a vida útil do leite. A relação ótima entre peróxido de hidrogênio e tiocianato, para a adequada ativação do sistema, foi estudada por diversos autores (CHAKRABORTY et alii 1986; e ROSSI, 1994), constatando-se que as concentrações podem variar desde 10 a 80mg.L⁻¹ de H₂O₂, com valores até 12mg.L⁻¹ de SCN⁻. As variações ocorrem em função de diferenças no tempo entre a ordenha e o início do método de conservação e, principalmente, no número inicial de microorganismo no leite (THAKER & DAVE, 1986). Não há problema toxicológico num consumo diário de tiocianato em níveis até 200mg (REITER & HARNULV, 1984), enquanto que a diminuição na concentração do peróxido de hidrogênio é tecnologicamente benéfico na produção de derivados do leite (SANTOS, 1985 e FURTADO, 1991).

Na bacia leiteira da Região de Pelotas, o recolhimento do leite à granel é realizado somente pela

parte da manhã, assim a ordenha da tarde permanece sob refrigeração (12 horas), aumentando o risco de alteração, principalmente se for considerado qualquer imprevisto até alcançar o processamento final na usina leiteira. Portanto, cabe verificar para este tipo de leite o tempo de conservabilidade, utilizando o sistema lactoperoxidase ativado.

O trabalho avalia o tempo de conservação do leite cru, ordenhado à tarde e resfriado por 12 horas, após ativação do sistema peroxidase, utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio e 12mg.L⁻¹ de tiocianato de sódio, tendo como controle a adição de peróxido de hidrogênio (ação direta).

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se leite cru integral, proveniente de uma micro-usina de Pelotas-RS, apresentando contagem total de bactérias mesofílicas de 4,4x10⁵ UFC/ml.

Procedimento experimental

Amostras de leite coletadas na micro-usina às 7 horas da manhã, com tempo de ordenha de 12 horas e mantidas sob refrigeração, foram submetidas à contagem total de bactérias mesofílicas e verificação da presença de peroxidase e ausência de catalase.

Foram retiradas 9 alíquotas (500ml de leite). Uma foi usada como testemunha e às outras foram adicionados 12 mg de tiocianato de sódio e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 4, 8, 12, 16, 20, 24, 40, 60mg, por litro de leite. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente (20°C±2°C) por 12 horas. Verificou-se a ação isolada do peróxido de hidrogênio, como agente conservador, utilizando-se as mesmas concentrações anteriormente citadas, ou seja, sem adição de tiocianato de sódio. As avaliações foram em triplicata com quatro repetições em dias distintos.

TABELA 01 - Ácido láctico(%) em leite com peróxido de hidrogênio e tiocianato de sódio*

incubação (horas)	Peróxido de hidrogênio (mg/l)								
	zero	4	8	12	16	20	24	40	60
zero	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
4	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
8	0,20	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,19
12	0,23	0,21	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,20

*-12mg/l de tiocianato de sódio

ROSSI (1994), estudando a atividade da lactoperoxidase e a preservação do leite cru (leite B), o tempo foi de 12 horas, empregando 4 a 16mg.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. O aumento de concentrações

Métodos

Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, conforme descrito no APHA, 1984.

Peroxidase, conforme o LANARA, Ministério da Agricultura, 1981.

Catalase, de acordo com técnica descrita por SCHULTZ, 1960.

Acidez titulável, por titulação pelo método Dornic, segundo Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985.

pH, por pH-metro eletrônico, modelo B374, marca Micronal.

Estabilidade ao álcool, conforme descrito pelo LANARA, Ministério da Agricultura, 1981

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O parâmetro adotado como indicativo da qualidade do leite foi 0,18%, em ácido láctico, por ser o valor máximo permitido para que o mesmo seja utilizado no consumo humano, de acordo com o Regulamento do Ministério da Agricultura, 1962.

A Tabela 1 mostra que tanto no controle como na amostra adicionada de 4mg.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, o tempo de conservação do leite foi de 4 horas, enquanto que a adição de 8mg.L⁻¹ aumentou esse período para 8 horas, mostrando melhor ação do sistema lactoperoxidase, em termos de acidez. Resultados semelhantes também podem ser vistos nas Tabelas 2 e 3, em termos de pH e estabilidade ao álcool, respectivamente. Esse tempo de preservação também foi obtido com concentrações de 12 até 40mg.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, porém com 60mg.L⁻¹ houve uma diminuição na conservação para 4 horas.

de peróxido de hidrogênio de 20 a 80mg.L⁻¹, também provocaram uma diminuição na eficiência do sistema lactoperoxidase devido, segundo o autor, à inativação gradativa da enzima, enquanto que acima de 100mg.L⁻¹,

o efeito conservativo foi exclusivamente devido a ação oxidativa da água oxigenada. Efeito semelhante pode ter ocorrido, neste experimento, a partir de 40mg.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, ainda que o tempo de

conservação alcançado seja menor. Alguns fatores podem ter contribuído para diminuir a eficácia do sistema peroxidase, entre os quais o tempo compreendido entre a ordenha e a ativação do mesmo.

TABELA 02 - Estabilidade do leite ao álcool com peróxido de hidrogênio e tiocianato de sódio*

incubação (horas)	Peróxido de hidrogênio (mg/l)									
	zero	4	8	12	16	20	24	40	60	
zero	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
8	I	+	E	E	E	E	E	E	E	+
12	I	++	++	+	+	+	+	++	++	++

*-12mg/l de tiocianato

E - estável

+ - instável pouco pronunciado

++ - instável fortemente pronunciado

TABELA 03 - pH do leite com peróxido de hidrogênio e tiocianato de sódio*

incubação (horas)	Peróxido de hidrogênio (mg/l)									
	zero	4	8	12	16	20	24	40	60	
zero	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75
4	6,68	6,70	6,70	6,72	6,72	6,72	6,72	6,72	6,72	6,72
8	6,52	6,57	6,63	6,64	6,64	6,64	6,62	6,62	6,62	6,61
12	6,26	6,43	6,48	6,47	6,52	6,52	6,51	6,51	6,51	6,50

*-12mg/l de tiocianato de sódio

As Tabelas 4 a 6, mostram o efeito isolado do peróxido de hidrogênio (controle) como agente bactericida, o qual manteve a conservação do leite cru por 4 horas nas concentrações de 4, 8 e 12mg.L⁻¹ e para um tempo de 8 horas foram necessárias de 16 a 24mg.L⁻¹. O uso de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 40 e 60mg.L⁻¹, conservou o leite cru por apenas 4 horas. Estes dados diferem dos obtidos

por ROSSI(1992), o qual verificou que concentrações superiores a 24mg.L⁻¹ aumentam gradualmente o tempo de manutenção da qualidade do leite. Já GUPTA et alii (1986), mencionaram que a manutenção da qualidade do leite por 8 horas a 30°C necessita de 30mg.L⁻¹ de água oxigenada e que, se essa concentração for aumentada para 100mg.L⁻¹, esse tempo pode ser estendido para 12 horas.

TABELA 04 - Porcentagem de ácido láctico em leite com peróxido de hidrogênio

incubação (horas)	Peróxido de hidrogênio (mg/l)									
	zero	4	8	12	16	20	24	40	60	
zero	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
4	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
8	0,20	0,19	0,19	0,19	0,18	0,18	0,18	0,19	0,19	0,19
12	0,23	0,21	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

TABELA 05 - Estabilidade do leite ao álcool com peróxido de hidrogênio

incubação (horas)	Peróxido de hidrogênio (mg/l)									
	zero	4	8	12	16	20	24	40	60	
zero	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
8	++	+	+	+	E	E	E	+	+	+
12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

E - estável

+ - instável pouco pronunciado

++ - instável fortemente pronunciado

TABELA 06 - pH em leite com peróxido de hidrogênio

incubação (horas)	Peróxido de hidrogênio (mg/l)								
	zero	4	8	12	16	20	24	40	60
zero	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75	6,75
4	6,68	6,71	6,71	6,71	6,71	6,72	6,72	6,72	6,72
8	6,52	6,61	6,61	6,62	6,64	6,64	6,64	6,61	6,61
12	6,29	6,45	6,45	6,45	6,47	6,47	6,48	6,48	6,48

CONCLUSÕES

Há possibilidade de conservação do leite cru integral à 20°C(±2°C), por 8 horas, utilizando 12mg.L⁻¹ de tiocianato de sódio e 8mg.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, em ação isolada, necessita o dobro da concentração para alcançar o mesmo tempo de conservação do leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Washington -Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 1984. 914p
- AUNE, T.M.; THOMAS, E.L.. Accumulation of hypothiocyanate ion during peroxidase catalysed oxidation of thiocyanate ion. Eur. **J. Biochemistry**, 17:1005-10, 1978.
- BRASIL -Ministério da Agricultura. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Brasília, 1962.
- BRASIL - Ministério da Agricultura - LANARA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II -métodos físicos e químicos. Brasília, 1981.
- BUSANI, Sílvia Fátima Borges. Leite Pasteurizado - Sua Qualidade desde a Fonte de Produção. **Colet. ITAL**, Campinas, 19(2):101-112, jul./dez. 1989.
- CHAKRABOTY, B. K.; CHAUDRY, S.S.; ALEX, K.A.; JACOB,G.; SONI, G.J. Application of the lactoperoxidase system in milk against Pseudomonas and other Gram negative bacteria.

Appl. Microbiol., Washington, v. 30, p.199-204, 1975.

- FURTADO, M.M. A arte e a Ciência do Queijo. Ed. Globo, São Paulo, 1991,297p.
- GUPTA, V.K.; PATEL, R.S.; DATIL, G.R.; SINGH, S.; MATHUR, B.N.. Preservation of milk with hydrogen peroxide and lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide system. **Indian J. Dairy Sci.**, New Delhi, v.39,p.269-76, 1986.
- PRUITT, K.M.; TENOVUO, J.;ANDREWS, R.W.; MCKANE, T.. Lactoperoxidase-catalyzed oxidation products. **Biochemistry**, 21:562-7, 1982.
- ROSSI, E.A.. O sistema lactoperoxidase na preservação de leite cru nas condições brasileiras. Dissertação de Doutorado. Campinas, Unicamp, 1992.126p.
- ROSSI, E.A.; OLIVEIRA, J.S.; FARIA, J.B.. Efeito da concentração de água oxigenada na eficiência do sistema lactoperoxidase ativado em leite. **Ciência e Tecn. de Alimentos**, Campinas, 14(2):178-88, 1994.
- SANTOS, E.C.. Presença de inibidores no leite fresco e suas consequências. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Belo Horizonte, 40(24):3-14, 1985.
- SÃO PAULO - Instituto Adolfo Lutz - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3ed. São Paulo, 1985. 37p.
- SCHULTZ, H.W.. Food Enzymes. Connecticut:Dheavi Publishing Company, 1960. 144p.
- THAKER, R.P.; DAVE, J.M. Application of the activated lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system in enhancing the keeping quality of raw buffalo milk at higher temperatures. **Milkwissenschaft**, Kiel, v.41, p.20-2, 1986.