

**Moisa Medeiros Lasmar**

**DETECÇÃO DE SORO LÁCTEO POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM AMOSTRAS DE LEITE  
CRU CONSERVADAS EM BRONOPOL**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Minas Gerais, Escola de  
Veterinária, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Medicina  
Veterinária**

**Área de concentração: Tecnologia e  
Inspeção de Produtos de Origem Animal  
Orientador: Leorges Moraes da Fonseca**

**Belo Horizonte**

**Escola de Veterinária da UFMG**

**2007**

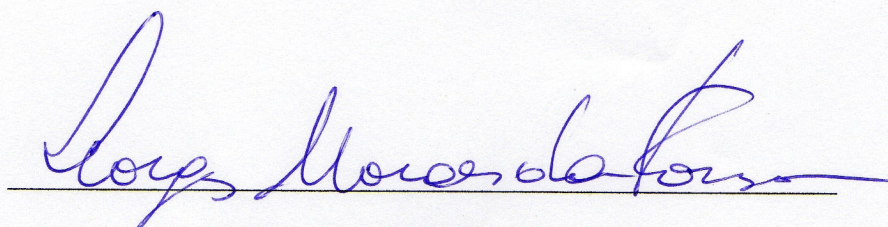
L345d Lasmar, Moisa Medeiros, 1980-  
Detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de leite cru conservadas em bronopol / Moisa Medeiros Lasmar. – 2007.  
38 p. : il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

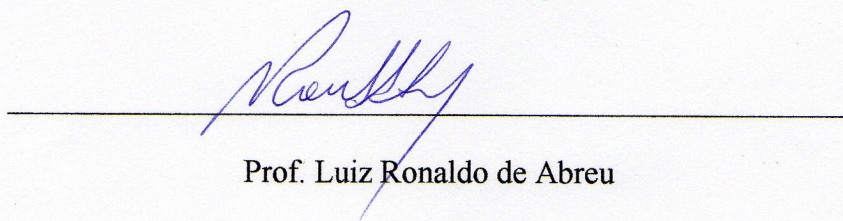
1. Leite – Análise – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Soro de queijo – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

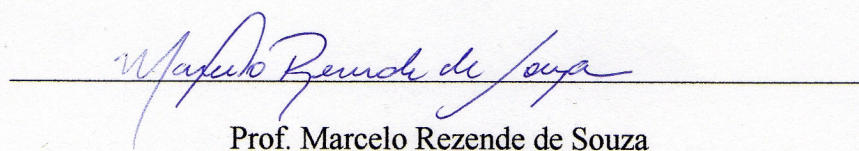
Dissertação defendida e aprovada em 02 de março de 2007 pela Comissão Examinadora  
constituída por:

A handwritten signature in blue ink, reading "Leorges Moraes da Fonseca", written over a horizontal line.

Prof. Leorges Moraes da Fonseca  
(Orientador)

A handwritten signature in blue ink, reading "Luiz Ronaldo de Abreu", written over a horizontal line.

Prof. Luiz Ronaldo de Abreu

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcelo Rezende de Souza", written over a horizontal line.

Prof. Marcelo Rezende de Souza



“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”

Friedrich Nietzsche

*Aos meus queridos pais, Jamil e Juçara,  
por todo carinho, apoio e incentivos  
constantes.*

## AGRADECIMENTOS

Ao João, meu amor, por estar sempre ao meu lado, pela paciência e pelo auxílio durante todo o mestrado.

Às minhas irmãs, Mônia e Moema, por estarem presentes durante minhas conquistas e à minha sobrinha Adriana por ter trazido tanta alegria às nossas vidas.

Ao Professor Leorges Moraes da Fonseca pela orientação e confiança.

À Professora Mônica Leite pela colaboração, amizade, ensinamentos e conselhos.

Ao Professor José Maria Ferreira pela oportunidade concedida.

Aos membros da Comissão Examinadora pelas contribuições.

Ao Professor Ivan Sampaio pelo seu tempo e auxílio na análise estatística.

À Professora Cláudia por ter despertado em mim o interesse por essa área.

Aos Professores Marcelo, Mônica Cerqueira e Afonso por serem ótimos mestres.

Aos funcionários do DTIPOA, Maura, Miltinho e Marco Antônio por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Professor Ronon e às meninas do Lab-UFMG pela colaboração.

Ao José Antônio por ter auxiliado nas coletas e a todas as Fazendas que cederam as amostras.

Aos colegas Alice, Andréia Kelly e Pedro pela ajuda imprescindível;

Liana, Andréa e Joana pela amizade encontrada onde eu menos esperava;

E Cristiane Alves, Débora, Regina e Sarita por encontrar em vocês força nos momentos difíceis e companhia para todas as horas.

Ao Sérgio Dracz e Júnio Macena do LANAGRO/MG pelo treinamento e dicas valiosas.

Ao Dr. Altino e ao Instituto Mineiro de Agropecuária pela compreensão e por permitirem a conclusão do experimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

E a Deus por tudo.

---

## SUMÁRIO

---

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....   | 10 |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 10 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 11 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 11 |
| 2.1. LEITE E FRAUDES .....  | 11 |
| 2.2. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CARACTERÍSTICAS<br>MICROBIOLÓGICAS DO SORO LÁCTEO .....    | 12 |
| 2.3. FRAUDES POR ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO EM LEITE E<br>METODOLOGIAS DE PESQUISA .....      | 14 |
| 2.4. CARACTERIZAÇÃO DO MACROPEPTÍDEO LIBERADO PELA AÇÃO<br>DA QUIMOSINA .....               | 15 |
| 2.5. MÉTODOS OFICIAIS DE DETECÇÃO DA FRAUDE POR ADIÇÃO DE<br>SORO DE QUEIJO EM LEITE .....  | 17 |
| 2.5.1. Método da dosagem do ácido siálico livre .....                                       | 17 |
| 2.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência .....                                       | 19 |
| 2.6. OCORRÊNCIA DE PROTEÓLISE COMO FATOR INTERFERENTE NA<br>PESQUISA DE SORO EM LEITE ..... | 23 |
| 2.7. CONSERVANTE BRONOPOL .....   | 24 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 25 |
| 3.1. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS .....  | 25 |
| 3.2. PREPARO DO SORO DE QUEIJO .....  | 25 |
| 3.3. PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EQUIPAMENTO DE<br>CROMATOGRAFIA .....                | 25 |
| 3.4. PROCEDIMENTO DE ANÁLISE .....  | 25 |
| 3.5. CÁLCULOS .....   | 26 |
| 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 26 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 26 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 5.   | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 29 |
| 6.   | <b>CONSIDERAÇÃO FINAL</b> .....   | 29 |
| 7.   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                   | 30 |
| 8.   | <b>ANEXOS</b> .....   | 35 |
| 8.1. | Cromatograma da curva de calibração (amostra branca) .....                | 35 |
| 8.2. | Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 2% de soro) .....  | 35 |
| 8.3. | Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 5% de soro) .....  | 36 |
| 8.4. | Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 10% de soro) ..... | 36 |
| 8.5. | Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 20% de soro) ..... | 37 |
| 8.6. | Curva de regressão linear .....   | 38 |

---

### LISTA DE QUADROS

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Quadro 1 - | Principais métodos cromatográficos utilizados para detecção de caseinomacropéptido em produtos lácteos ..... | 21 |
|------------|--|----|

---

### LISTA DE TABELAS

---

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Concentrações médias de soro, obtidas por CLAE, em amostras de leite adicionadas de cinco níveis de soro em função da adição ou não de conservante, e das temperaturas e tempos de armazenamento ..... | 26 |
|------------|--|----|

---

### LISTA DE GRÁFICOS

---

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Gráfico 1 - | Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado, adicionadas de 2% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30° C, durante oito dias de armazenamento ..... | 28 |
| Gráfico 2 - | Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado,  |    |



|             |  |    |
|-------------|--|----|
|             | adicionadas de 5% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30° C,<br>durante oito dias de armazenamento .....  | 28 |
| Gráfico 3 - | Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado,<br>adicionadas de 10% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30° C,<br>durante oito dias de armazenamento ..... | 28 |
| Gráfico 4 - | Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado,<br>adicionadas de 20% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30° C,<br>durante oito dias de armazenamento ..... | 29 |

---

### LISTA DE FIGURAS

---

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 1 - | Desenho esquemático da micela de caseína .....            | 16 |
| Figura 2 - | Desenho esquemático de detalhe da micela de caseína ..... | 17 |
| Figura 3-  | Composição estrutural do ácido siálico .....              | 18 |
| Figura 4 - | Composição estrutural do bronopol .....                   | 24 |

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do uso de amostras de leite cru conservadas com bronopol na pesquisa de soro de queijo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram testadas duas temperaturas de armazenamento (7 e 30° C) para as amostras contendo bronopol. As amostras sem conservante (controle) foram mantidas sob congelamento (-10° C). Todos os grupos foram testados quanto ao tempo de estocagem por até oito dias. A cada grupo, foram adicionados cinco níveis de soro de queijo (0, 2, 5, 10 e 20%). Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, possibilitando concluir que é possível utilizar amostras de leite cru conservadas com bronopol para pesquisa de soro de queijo em leite por CLAE. O tempo e a temperatura de armazenamento não interferiram nessa metodologia de pesquisa para amostras conservadas com bronopol, estocadas sob refrigeração ou à temperatura ambiente por até oito dias.

Palavras-chave: leite cru, bronopol, detecção de soro, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## ABSTRACT

*The objective of this study was to evaluate the viability of the use of raw milk samples conserved with bronopol in the detection of cheese whey by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The samples added by bronopol were stored in two temperatures (7 and 30° C) and the control samples (without preservative) were kept under freezing. All the groups were tested for the time of storage up to eight days. In each group were added five levels of cheese whey (0, 2, 5, 10 and 20%). There was no difference ( $p > 0.05$ ) among the treatments thus, it is possible to use samples of raw milk conserved with bronopol in the detection of cheese whey by HPLC. The storage time and temperature did not interfere in this methodology for samples conserved with bronopol stored cooled or at room temperature up to eight days.*

*Keywords: raw milk, bronopol, whey detection, high performance liquid chromatography (HPLC).*

## 1. INTRODUÇÃO

Visando a melhoria da qualidade higiênico-sanitária do leite cru produzido no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou, em 2002, a Instrução Normativa nº 51, que estabelece padrões legais para o controle da qualidade do leite brasileiro. Esses padrões incluem composição físico-química (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos), contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, crioscopia e resíduos de antimicrobianos (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002).

Para atender a essa norma, foi criada a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) visando analisar as amostras que as indústrias de laticínios, sob inspeção federal, passaram a coletar mensalmente de seus produtores.

As amostras, uma para composição e contagem de células somáticas, adicionada do conservante bronopol e outra para contagem bacteriana, adicionada do conservante azidiol, são coletadas nos tanques de refrigeração de leite em cada propriedade, normalmente, pelos motoristas dos próprios caminhões isotérmicos. Elas são acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e enviadas, imediatamente, a um dos laboratórios da RBQL.

A viabilidade do aproveitamento destas amostras para efetuar a pesquisa de soro de queijo em leite representaria um ganho tanto econômico quanto logístico para as indústrias e para os laboratórios envolvidos, na medida em que possibilitaria a referida análise sem a coleta de uma nova amostra, e permitiria que a indústria tivesse um controle de seus produtores em relação a fraudes, pois, usualmente, a pesquisa de soro é realizada apenas em leite

beneficiado, coletado nas indústrias pelos fiscais do MAPA.

No caso de uma indústria obter um resultado insatisfatório nesta análise, não sendo a responsável pela fraude, poderá entrar em contato com o laboratório da RBQL que a atenda e solicitar a pesquisa de soro no leite dos produtores que compõem aquela linha onde foi coletada a amostra para a produção daquele lote.

Portanto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a viabilidade do uso de amostras de leite cru contendo o conservante bronopol para a pesquisa de soro de queijo em leite por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e verificar se o tempo e a temperatura de armazenamento dessas amostras interfere nessa análise.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leite e fraudes

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (art. 475 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, RIISPOA) (Brasil, 1997). Segundo o artigo 543 do RIISPOA, é considerado fraudado, adulterado ou falsificado, o leite que for adicionado de quaisquer elementos estranhos à sua composição (Brasil, 1997).

No mesmo sentido, a Lei Federal nº 8.078, de 11/09/1990, dispõe que são impróprios ao uso e consumo os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, perigosos ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas

regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação (Brasil, 1990).

É ainda, vedado ao fornecedor de produtos ou serviços, dentre outras práticas abusivas, colocar no mercado de consumo qualquer produto ou serviço em desacordo com as normas expedidas pelos órgãos oficiais competentes ou, se normas específicas não existirem, pela Associação Brasileira de Normas Técnicas ou outra entidade credenciada pelo Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Conmetro) (Brasil, 1990).

A adição de soro é permitida em alguns produtos como o creme de leite, a manteiga comum (Ministério da Agricultura..., 2000), os leites fermentados, as bebidas lácteas e alguns queijos (Souza, 2002).

Segundo Brandão, a fraude com soro de leite é comum e, em poucos dias, o soro se mistura perfeitamente ao leite, podendo ser detectado apenas por testes laboratoriais caros, ao contrário do leite em pó, no qual a fraude é mais facilmente detectada. Em Minas Gerais, foi detectado leite adulterado em 21 amostras de 38 analisadas, sendo que, em uma delas o teor de adição de soro ao leite chegou a 60%. Para o consumidor, a diferença entre o leite puro e o fraudado é imperceptível para um grau de adição de soro de até 20%, acima disto, o leite parece aguado (Pesquisa ..., 2003).

Em uma *blitz* realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento detectou-se a adição proibida de soro de leite em 43% das 74 indústrias analisadas em 13 estados brasileiros. A fiscalização do órgão apreendeu 162,9 toneladas de produtos lácteos fora dos padrões. A fiscalização apreendeu também 3,18 toneladas de leite longa vida (UAT) e 1,9 toneladas de leite em pó integral fraudadas (Leite ..., 2003).

O Ministério Público Federal, por meio da Procuradoria da República em Pernambuco, ofereceu denúncia contra oito pessoas presas na chamada Operação Soro, realizada em conjunto com o Departamento de Polícia Federal (DPF) e a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA. Os denunciados foram presos sob acusação de fraudar leite em pó integral há vários anos, mediante a adição de substâncias como maltodextrina, soro de leite, soro de queijo em pó, sacarose, amido e até soda cáustica. Para mascarar o teor mínimo de gordura exigido para o leite integral, o MAPA acredita que era adicionada gordura vegetal ao leite adulterado. Além de produzir marcas próprias de leite, o grupo foi acusado de falsificar várias marcas tradicionais de leite integral (Miranda, 2004).

Com tais condutas, o consumidor é lesado de dois modos. Primeiro, pela ofensa aos princípios da transparência, da harmonia das relações de consumo, da boa fé e da devida informação, na medida em que permite a oferta do produto sem a indicação de sua verdadeira composição, e, portanto, enganando os consumidores a ela sujeitos, nas padarias e supermercados, mesmo que não os tenha adquirido. Segundo, pela ofensa a um dos princípios básicos da Política Nacional das Relações de Consumo, qual seja a defesa do interesse econômico dos consumidores, pois coloca no mercado de consumo produto impróprio ao uso e consumo e permite a sua revenda, obtendo vantagem ilícita (Brasil, 1990).

## **2.2. Composição físico-química e características microbiológicas do soro lácteo**

O soro lácteo é um derivado da fabricação de queijos, caseinatos e seus derivados, que se separa do coágulo durante a fabricação convencional. Ele representa 80 a 90% do volume de leite que entra na produção do queijo, e possui, aproximadamente, 50 a

55% dos constituintes do leite (Kosikowski, 1979). É um fluido opaco, amarelo esverdeado, sendo a riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) responsabilizada por essa coloração. A lactose é o componente presente em maior porcentagem na porção sólida, sendo responsável pelo seu sabor adocicado.

Existem dois tipos de soro. O soro doce (pH 5,9-6,6) é originado na fabricação da maior parte dos tipos de queijo, resultante da coagulação enzimática. O soro ácido (pH 4,3-4,6) é originado na fabricação de queijos por coagulação ácida, na qual além da cultura láctica, também pode ser adicionado ácido láctico.

O soro de queijo contém cerca da metade do extrato seco total do leite originalmente utilizado para a sua fabricação, apresentando, em média, 6,35 a 6,50% de sólidos totais, sendo cerca de 4,85 a 4,90% de lactose; 0,75 a 0,80% de proteínas (principalmente albuminas e globulinas); 0,04 a 0,50% de gordura, além de sais minerais (Kosikowski, 1979).

O valor nutricional do soro de queijo é de grande interesse para as indústrias de alimentos. Com o auxílio de técnicas modernas de separação, ele pode ser transformado, de um descarte industrial em um produto de muitas utilidades. O soro de queijo tem sido processado visando a obtenção de produtos como o soro em pó e a bebida láctea e diversas tecnologias estão sendo empregadas para a recuperação de seus componentes, com posterior transformação em produtos comercializáveis. Além disto, o aproveitamento do soro pode contribuir para a redução dos problemas ambientais causados pela sua eliminação em efluentes (Siqueira, 2000).

As mesmas proteínas e a lactose, que conferem um alto valor nutritivo ao soro, também são responsáveis pela alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) que o torna

uma importante fonte de poluição através de efluentes industriais (Teixeira, 2005).

Entretanto, resultados satisfatórios têm sido obtidos com a utilização do soro de queijo na indústria de panificação, confeitos, sorvetes e sobremesas geladas. Um uso relativamente novo para os sólidos do soro é como substrato, após o enriquecimento com substâncias promotoras de crescimento, para o preparo de culturas lácticas. O soro pode ser utilizado como ingrediente na fabricação de iogurtes e produtos lácteos fermentados, permitindo a otimização da vida de prateleira e do perfil da qualidade geral dos produtos (Siqueira, 2000).

Chiappini *et al.* (1995), citados por Siqueira (2000), avaliaram 30 amostras de soro de queijo minas frescal, e concluíram que o mesmo apresentava condições insatisfatórias na enumeração de coliformes totais e aceitáveis para coliformes fecais, e baixa contagem de bactérias heterotróficas aeróbicas mesófilas e psicrotróficas, demonstrando condições higiênicas satisfatórias de obtenção do soro.

Os soros dos queijos prato, mussarela, minas frescal e minas padrão, analisados por Siqueira (2000), não estavam aptos para utilização na forma *in natura*, como matéria-prima para a indústria alimentícia, devido as elevadas contagens de coliformes totais, coliformes fecais e de microrganismos mesófilos e psicrotróficos. Os elevados teores de nitratos, nitritos e aminas biogênicas encontrados limitavam o seu aproveitamento.

Teixeira (2005) analisou soros de queijos minas padrão e mussarela em quatro das cinco maiores regiões produtoras de leite e queijos de Minas Gerais e encontrou um nível de contaminação preocupante, principalmente quanto aos resultados das contagens de coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva, o que

caracterizou o material como impróprio para consumo humano e utilização industrial.

### **2.3. Fraudes por adição de soro de queijo em leite e metodologias de pesquisa**

O leite fraudado com soro de queijo, apesar de não apresentar as mesmas características do leite genuíno, não é detectado por técnicas de rotina de controle de qualidade do leite, motivo pelo qual algumas técnicas foram desenvolvidas com a finalidade específica de detectar este tipo de adulteração. Esses métodos se baseiam, principalmente, na alteração da distribuição protéica original do leite provocada por adição de soro de queijo, examinando-se esta distribuição nos níveis de nitrogênio, aminoácidos e proteínas (Furtado, 1989).

Furtado e Wolfschoon-Pombo (1988) aplicaram o teste de determinação do número de caseína, utilizando como base um valor médio de fósforo caseínico (0,85g/100g de caseína) e um fator Kjeldahl (6,34) para chegar ao número de caseína (nitrogênio caseínico/nitrogênio protéico) na quantificação de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado. Os autores encontraram quatro das nove amostras analisadas adulteradas com soro de queijo.

Alvim (1992) analisou, pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência – filtração em gel (CLAE – FG), amostras de leite tipo C e leite em pó comercializadas em alguns estados do Brasil, e verificou que parte desses produtos foram adicionados de soro de queijo e/ou água.

Segundo Alvim (1992), os métodos de quantificação do ácido siálico livre, do teor total de sulfidrila, da proporção cisteína/cistina, de aminoácidos, da eletroforese em gel de poliacrilamida, do método crioscópico e do número de caseína demandam excessivo trabalho laboratorial,

são demorados e apresentam limites mínimos de detecção quantitativa muito elevados. O método CLAE – FG não é capaz de detectar a adição de soro ácido e/ou do permeado ao leite pasteurizado, mas confirma a ausência de soro proveniente de coagulação enzimática.

Em se tratando da adição de soro ácido, sua determinação é das mais simples, por meio da estimativa do teor em lactato, sendo o método enzimático o mais recomendado. Ele consiste em oxidar o ácido láctico a piruvato por ação de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) na presença de lactato de hidrogenase (LDH) (Wolfschoon-Pombo, 1984).

Van Riel e Olieman (1995b), observaram que o pseudo-caseinomacropéptido, em que falta o resíduo de metionina na porção N-terminal, poderia ser separado do caseinomacropéptido (CMP), de forma a prevenir resultados falso positivos para alguns tipos de leite ácido em pó, por meio da técnica de eletroforese de zona capilar. Foi observado, também, que há uma detecção seletiva de CMP (variantes genéticas A e B) *versus* pseudo-CMP quando se usa um gradiente de acetona em água/ácido fluoroacético na metodologia de CLAE – fase reversa (Van Riel e Olieman, 1995a).

Recio *et al.* (1996) estudaram a atividade proteolítica de enzimas de bactérias psicrófilas sobre a caseína de leite cru e leite tratado em ultra alta temperatura, por meio de eletroforese capilar, a fim de caracterizar os produtos de degradação e avaliar a possibilidade de distingui-los daqueles devidos à ação da quimosina sobre a  $\kappa$ -caseína. Os autores afirmaram que isto pode dar origem a resultados falso positivos quando a presença de soro é investigada através de eletroforese capilar.

Dracz (1996) desenvolveu um método imunoenzimático para determinação de

soro de queijo adicionado ao leite. Uma vantagem do método desenvolvido em relação ao método oficial (CLAE – FG) é que permite analisar várias amostras ao mesmo tempo, dispensando o uso de equipamentos de alto custo, além de ser de fácil execução, possibilitando o uso inclusive em plataformas de laticínios, podendo ser utilizado para seleção de matéria-prima para a elaboração de leite UAT. Foi utilizado anticorpo policlonal que apresentou título de 960 e foi capaz de detectar até 1%, v/v, de soro de queijo adicionado ao leite.

Urbán *et al.* (1998) estudaram a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida do CMP liberado pela ação da quimosina sobre a  $\kappa$ -caseína e concluíram que o método permite detectar, em caráter qualitativo, a presença de soro de queijo em leite fresco e em pó, em níveis superiores a 2% (m/v), e que o método não apresenta interferências causadas por outros peptídeos gerados por proteólise de bactérias psicrotróficas (*Pseudomonas*) em leites resfriados.

Cartuyvels *et al.* (1999) apresentaram um método simples e rápido de espectroscopia para a quantificação de soro em pó em leite em pó. O método é baseado nas diferenças em proporção de tirosina para triptofano nas caseínas e proteínas do soro, e também pode ser usado para calcular a proporção de proteínas do soro para proteínas totais do leite em produtos lácteos. O método foi descrito como confiável, sensível e de fácil execução. E, até mesmo usando um espectrofotômetro simples, sem o modo de *scanner*, é possível demonstrar a presença de, pelo menos, 3% de soro em pó em leite em pó.

Montañez *et al.* (2000) testaram leite desidratado de três marcas comerciais mexicanas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e concluíram que as amostras não estavam

em acordo com as normas estabelecidas. De 108 amostras analisadas, 14,81% continham CMP.

Souza *et al.* (2000) investigaram a adulteração de bebidas lácteas distribuídas no Programa Nacional da Merenda Escolar (brasileiro), por meio da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida, e concluíram que o sistema desenvolvido, seguido de análise densitométrica, foi capaz de identificar e quantificar adulteração por adição de soro em misturas lácteas complexas. Cerca de 49% das bebidas lácteas sabor café e 29% das de sabor chocolate, de um total de 58 amostras analisadas por sabor, apresentaram adulteração. O soro foi adicionado para alcançar o total de proteínas especificado nos rótulos.

Benítez *et al.* (2001) estudaram a presença de soro de queijo em leite em pó por meio da determinação do CMP, por CLAE – FG. Das 13 amostras importadas, analisadas em Cuba, três apresentaram concentrações detectáveis de soro de queijo, havendo adição maior ou igual a 1% (v/v).

Urbán *et al.* (2002) estudaram a presença de CMP em leite fluido, cru e industrializado, vendido na cidade do México, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os autores encontraram 13,76% das amostras de leite cru, 57,1% de leite pasteurizado, e 37,5% das amostras de leite UAT positivas para a presença de CMP em níveis maiores que 2%, o que confirmou a adulteração com soro de queijo.

#### **2.4. Caracterização do macropeptídeo liberado pela ação da quimosina**

As caseínas constituem um grupo de fosfoproteínas específicas do leite, que se caracterizam por apresentar baixa solubilidade em pH 4,6. Elas estão na forma de micelas representadas por partículas interligadas, contendo maior proporção de

proteína e uma concentração considerável de cálcio e de fosfato (Pinto, 2004).

A  $\kappa$ -caseína é a fração mais solúvel das caseínas, na presença de uma ampla faixa de concentração do íon cálcio. Ela representa cerca de 15% do total das

caseínas, atuando como agente estabilizador da micela, é constituída por um polipeptídeo de 169 aminoácidos, com, pelo menos, um grupo fosfato e uma porção glicídica variável (Walstra e Jenness, 1984, citados por Furtado, 1989 e Dracz, 1996). Sua estrutura está ilustrada na Figura 1.

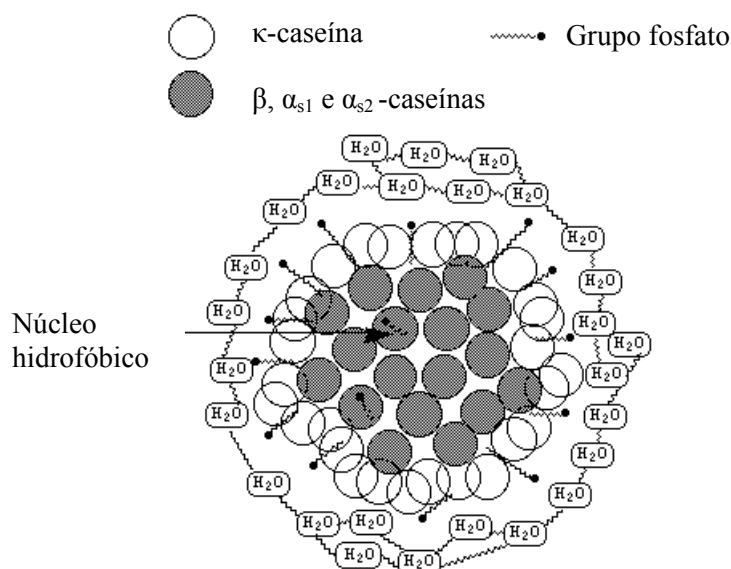


Figura 1 – Desenho esquemático da micela de caseína  
Fonte: <http://www.public.iastate.edu/~cfford/Caseinmicelle2.jpg>

Quando o agente coagulante atua sobre a caseína, especificamente na ligação 105-106 (Phe-Met) da seqüência de aminoácidos da  $\kappa$ -caseína, um macropeptídeo hidrofílico (aminoácidos 106 a 169) ligado ao ácido N-acetilneuramínico (NANA), é removido e passa para o soro, enquanto que a outra parte (aminoácidos 1 a 105) da  $\kappa$ -caseína, juntamente com outras frações da caseína e, sob a influência de íons  $\text{Ca}^{++}$ , formam o gel denominado para- $\kappa$ -caseinato (Wolfschoon-Pombo, 1984).

O polipeptídeo liberado durante a fase primária da coagulação pela ação da quimosina sobre a  $\kappa$ -caseína é formado a partir de uma seqüência de cerca de 64

aminoácidos, a quarta parte dos quais são hidroxiaminoácidos, regularmente distribuídos. Todos os carboidratos estão ligados covalentemente a este peptídeo, assim como o único grupo fosfato. O perfil dos aminoácidos e o seu conteúdo em açúcares tornam o CMP fortemente polar e, como consequência, ele fica solúvel no soro após a separação da massa (López-Fandiño e Ramos, 1992). A elevada estabilidade térmica do CMP se deve ao elevado teor de ácido siálico em sua estrutura (Chernova *et al.*, 1988, citados por Alvim, 1992 e Dracz, 1996).

Este macropeptídeo hidrofílico, resultado da ação da renina sobre a  $\kappa$ -caseína, era denominado glicomacropeptídeo (GMP),



por ser a única fração da caseína contendo glicídeos em sua estrutura (Alais, 1984). Mas, cerca de 40% da  $\kappa$ -caseína não é glicosilada (Vreeman *et al.*, 1986 citados por Dracz, 1996). A  $\kappa$ -caseína é heterogênea, apresentando duas variantes genéticas, A e B, podendo o teor de carboidratos na molécula variar de 0 a 15%

e, como há a possibilidade de se obter fragmentos com ausência glicídica, o peptídeo terminal pode ser chamado de macropeptídeo ou caseinomacropeptídeo (CMP) (Guinee e Wilkinson, 1992, citados por Fukuda, 2003), e está ilustrado na Figura 2.

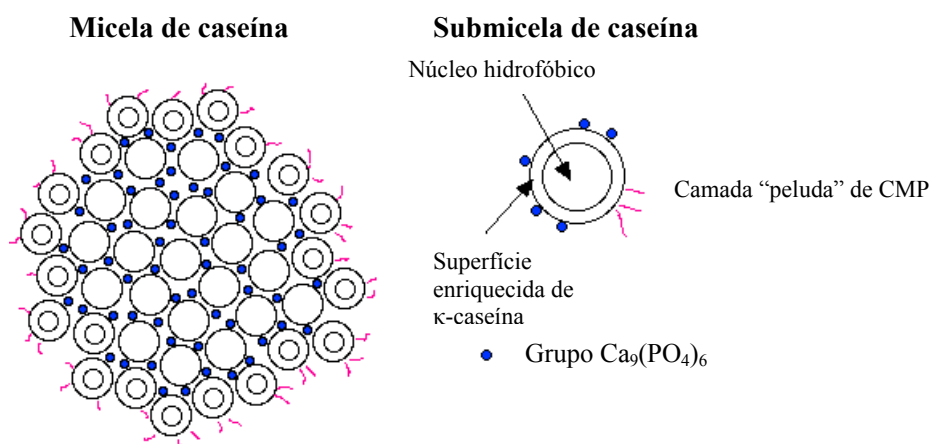


Figura 2 – Desenho esquemático de detalhe da micela de caseína  
 Fonte: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/deicon/casein.gif>

O CMP contém a porção C-terminal (aminoácidos 106 a 169) e o para- $\kappa$ -caseinato, um resíduo de baixa solubilidade, é constituído pela porção N-terminal (aminoácidos 1 a 105) (Alvim, 1992).

polarográficos e de cromatografia líquida de alto desempenho.

### 2.5. Métodos oficiais de detecção da fraude por adição de soro de queijo em leite

#### 2.5.1. Método de dosagem do ácido siálico livre

Segundo Wolfschoon-Pombo (1984), há várias formas de verificar a adulteração de leite em pó com soro em pó ou leite em pó: determinação fotométrica do teor de ácido siálico livre, determinação cromatográfica de glicomacropeptídeos, determinação polarográfica de cistina/cisteína, observação microscópica em luz polarizada e determinação do teor em fosfatídeos. Mas, os mais indicados para a avaliação qualitativa e quantitativa de fraude em leite em pó são os métodos

A determinação pelo método do ácido siálico, cujo nome químico é ácido N-acetilneuramínico (NANA) foi muito utilizada na década de 80. O NANA é um componente natural do leite, que se encontra ligado à proteína, especialmente na fração caseínica, formando parte da  $\kappa$ -caseína, junto com outros carboidratos (N-acetilgalactosamina e galactose) (Wolfschoon-Pombo, 1984). Sua composição estrutural está ilustrada na Figura 3.

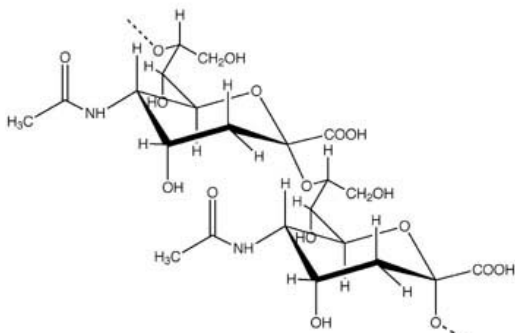


Figura 3 – Composição estrutural do ácido siálico  
 Fonte: [www.chori.org/.../Pictures/Fig1\\_moe.jpg](http://www.chori.org/.../Pictures/Fig1_moe.jpg)

Na detecção de soro em leite em pó, primeiro solubiliza-se o pó mediante adição de água e precipita-se a proteína com ácido tricloroacético (TCA). O macropéptido, originalmente contido no soro, ficará em solução no filtrado caso o leite em pó tenha sido adicionado de soro, e no precipitado encontrar-se-ão as proteínas do leite em pó. Para o isolamento do ácido siálico, é necessário precipitá-lo no filtrado de TCA, mediante adição de ácido fosfotúngstico (AFT). Após duas lavagens com etanol e secagem, o NANA é liberado mediante hidrólise ácida e centrifugação, sendo determinado no sobrenadante com resorcinol (Wolfschoon-Pombo, 1984).

Determinando-se dessa forma o teor de ácido siálico na amostra, pode-se facilmente calcular a quantidade de soro adicionado, através da fórmula:

$$\% \text{ soro em pó} = \frac{(Z - Y) \times 100}{W}$$

Em que: Z refere-se ao valor determinado na amostra;

Y representa o valor médio de NANA no leite em pó;

W representa o valor médio de NANA no soro em pó (Wolfschoon-Pombo, 1984).

Segundo Furtado (1989), a utilização deste método no Brasil exige, primeiramente, um conhecimento prévio do teor de ácido siálico livre do leite, leite em pó e soro da

produção nacional, seus valores médios e variações. É preciso conhecer, também, os parâmetros tecnológicos, como o efeito dos diversos tipos de tratamento térmico a que o leite está sujeito durante o processo de desidratação, que podem influir na dosagem do NANA.

De acordo com Potgieter (1985), citado por Furtado (1989), investigações demonstraram que este método é influenciado por quantidades residuais de lactose, que não é eliminada completamente na preparação da amostra, sendo que uma adição de 50 a 100 µg/mL no sobrenadante (livre de lactose) resultou em um aumento de 2,7 a 16% no conteúdo de ácido siálico determinado.

Panetta *et al.* (1987) conduziram estudos com 75 amostras de 29 rebanhos leiteiros no estado de São Paulo visando verificar a eficácia do método de detecção de adição de soro de queijo que apresentou baixa especificidade (75%) e elevada sensibilidade (100%). Os autores relataram ainda que a presença de bactérias psicotróficas, as condições de manejo e, particularmente, o período de lactação podem interferir nos resultados.

Polak e Bradley Jr. (1994) descreveram um método simples e sensível, baseado na detecção de ácido siálico envolvendo uma reação de coloração com o reagente de Ehrlich. A coloração roxa formada com adição de 1% de soro de creme em creme fresco foi claramente visível, até mesmo para olhos não treinados. O procedimento facilitou a detecção de pequenas quantidades de soro de creme em creme fresco, antes ou depois da fabricação da manteiga. No entanto, de acordo com Furtado (1989), o método não é confiável para amostras de leite refrigerado por um período superior a 48 horas, no qual a proteólise desencadeada por bactérias psicotróficas pode, eventualmente, liberar

da fração protéica o NANA, induzindo um resultado falso positivo.

Segundo Fukuda (2003), o método da ninidrina ácida utilizando-se a espectrofotometria na região visível do espectro, a 470 nm, para a determinação quantitativa de ácido siálico livre ou ligado ao glicomacropéptido da  $\kappa$ -caseína na pesquisa de fraude de adição de soro de queijo ao leite fluido, além de ser de fácil execução, tem se mostrado eficiente na rotina laboratorial.

De acordo com a Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003 (Ministério da Agricultura ..., 2003), a identificação de ácido siálico livre e ligado à glicoproteína do leite é considerada como Método Analítico Oficial Físico-Químico para Controle de Leite e Produtos Lácteos.

### 2.5.2. Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (Collins, 1988).

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett que, em 1906, os utilizou em dois trabalhos descrevendo suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas e gema de ovo, nos quais usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os

componentes com éter de petróleo. O nome deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphe* (escrever), embora o processo não dependa da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (Collins, 1988).

A cromatografia líquida em coluna se divide em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel devido à força da gravidade; e a cromatografia líquida de alta eficiência, que usa colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão (e, por isto, também é chamada de cromatografia líquida de alta pressão) que pode empurrar a fase móvel com vazão mais rápida (resultando em outro nome: cromatografia líquida de alta velocidade). Sugere-se, como nome preferido desta técnica, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido a sua característica mais importante, que é a elevada eficiência atingida na separação (Collins, 1988).

Segundo Wolfschoon-Pombo (1984), a mistura de leite em pó com soro em pó também pode ser detectada e quantificada através da CLAE, utilizando o método sugerido pelos holandeses van Hooydonk e Olieman (1982). Esse método é baseado na determinação do teor de CMP na amostra suspeita.

Neste método, faz-se a reconstituição do pó (11% m/m) em água; 39 gramas dessa solução são coagulados em 50 mL de quimosina (10mg quimosina/50g de água) a 31°C. Após um período determinado, removem-se as proteínas (caseínas e soroproteínas) mediante adição de ácido tricloroacético numa concentração final de 8%; 15µL do filtrado são injetados automaticamente no aparelho de CLAE e, após 40 minutos, obtém-se o cromatograma completo. Como branco usa-se leite em pó puro, e seguem-se todas as operações da

marcha analítica, excetuando a adição do coalho (Wolfschoon-Pombo, 1984).

De acordo com Wolfschoon-Pombo (1984), a repetibilidade do método é muito boa, principalmente devido ao pré-tratamento das amostras, que não requer muitas operações. Um coeficiente de variação menor que 2%, e independentemente do teor em CMP das amostras, pode ser esperado.

O método de CLAE foi originalmente desenvolvido para acompanhar a ação da quimosina no leite e também pode ser utilizado para determinar a atividade proteolítica de coalhos comerciais e substitutos (Wolfschoon-Pombo, 1984). A reação da hidrólise da  $\kappa$ -caseína pela quimosina é a primeira etapa da coagulação do leite para fabricação de queijos pelo processo enzimático (Dracz, 1996).

O limite de detecção dessa técnica é de 0,8% de sólidos totais de soro adicionado a leite desnatado e leite de leiteiro desnatado em pó (Olieman e van den Beden, 1983 citados por Wolfschoon-Pombo, 1984).

O CMP possui caráter hidrofílico, devido à polaridade conferida pelos seus constituintes; estabilidade térmica elevada, devido ao elevado conteúdo de ácido siálico em sua estrutura; peso molecular de

aproximadamente 8.000 Daltons, podendo ser separado de outros peptídeos e proteínas por meio de colunas de CLAE – FG. Contrariamente, o resíduo para- $\kappa$ -caseinato apresenta caráter hidrofóbico (Alvim, 1992).

A quantificação do CMP parece ser um dos métodos mais recomendáveis para se quantificar a adição de soro de queijo ao leite. Esta determinação pode ser feita por eletroforese, e quantificada tanto por densitometria como por CLAE (Alvim, 1992).

Segundo Alvim (1992), experimentos conduzidos por Olieman e van Riel (1989), visando o desenvolvimento de um método preciso para a detecção de sólidos do soro, demonstraram que a presença de falsos resultados positivos, em leite em pó e leiteiro em pó, pode ser detectada por CLAE em coluna de fase reversa. O limite de detecção foi de 0,2% de sólidos de soro em pó (m/m), sendo o método considerado como oficial pelo Mercado Comum Europeu, em 1990.

López-Fandiño e Ramos (1993) fizeram uma revisão sobre os métodos de detecção da presença de soro de queijo em produtos lácteos, cujo resumo se apresenta no Quadro 1.

Quadro 1 – Principais métodos cromatográficos utilizados para detecção de caseinomacopeptídeo em produtos lácteos

| Técnica cromatográfica | Fase estacionária | Eluentes  | Deteção | Amostra                               | Preparação da amostra                       | Objetivo                              | Referência                     |
|------------------------|-------------------|---|---------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|--------------------------------|
| Exclusão molecular     | TSK 2000 SW       | 0,10 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,01 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$<br>0,15 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ | 205 nm  | Leite em pó                           | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Detectar a adição de soro             | Olieman e van den Bedem (1983) |
| Exclusão molecular     | TSK 2000 SW       | 0,10 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,01 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$<br>0,15 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ | 205 nm  | Leite cru                             | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Determinar proteólise                 | Mottar et al. (1985)           |
| Exclusão molecular     | TSK 2000 SW       | 0,10 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,01 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$<br>0,15 M $\text{NaHSO}_4$         | 205 nm  | Leite e nata inoculadas               | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Detectar a adição de soro             | De Vilder et al. (1988)        |
| Exclusão molecular     | TSK 2000 SW       | 0,10 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,01 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$<br>0,15 M $\text{NaHSO}_4$         | 205 nm  | $\kappa$ -caseína tratada com coláho  | Precipitação de proteínas com TCA 3,7 e 12% | Determinar a cinética da reação       | Vreeman et al. (1986)          |
| Exclusão molecular     | TSK 2000 SW       | 0,10 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$<br>0,01 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$<br>0,15 M $\text{NaHSO}_4$         | 205 nm  | Leite e caseinato tratados com coalho | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Caracterização do caseinomacopeptídeo | Morr e Seo (1988)              |
| Fase reversa           | Ultrapore RPSC    | a) 0,15 M $\text{NaCl-HCl}$ , pH 2,1<br>b) $\text{CH}_3\text{CN}$                                     | 210 nm  | Leite e caseinato tratados com coalho | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Caracterização do caseinomacopeptídeo | Morr e Seo (1988)              |
| Fase reversa           | Ultrapore RPSC    | a) 0,01 M TFA<br>b) 0,01 M TFA em $\text{CH}_3\text{CN}$  | 210 nm  | Leite e caseinato tratados com coalho | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Caracterização do caseinomacopeptídeo | Morr e Seo (1988)              |
| Fase reversa           | Ultrapore RPSC    | a) 0,1% TFA em 15% $\text{CH}_3\text{CN}$ 2% isopropanol<br>b) 0,1% TFA em 30% $\text{CH}_3\text{CN}$ | 210 nm  | Leite em pó                           | Precipitação de proteínas com TCA 8%        | Detectar a adição de soro             | Olieman e van Riel (1989)      |

Fonte: Adaptada de López-Fandiño e Ramos (1993)

Continuação do Quadro 1

| Técnica cromatográfica | Fase estacionária         | Eluentes   | Deteção | Amostra                      | Preparação da amostra   | Objetivo  | Referência                |
|------------------------|---------------------------|--|---------|------------------------------|---|---|---------------------------|
| Fase reversa           | Protein Plus              | a) 0,1% TFA em 15% CH <sub>3</sub> CN:2% isopropanol<br>b) 0,1% TFA em 55% CH <sub>3</sub> CN:2% isopropanol | 210 nm  | Leite em pó                  | Precipitação de proteínas com TCA 8%                                | Detectar a adição de soro                               | Olieman e van Riel (1989) |
| Fase reversa           | Spherisorb ODS 2          | a) 0,11% TFA em 20% CH <sub>3</sub> CN<br>b) 0,10% TFA em 60% CH <sub>3</sub> CN                             | 205 nm  | Leite em pó                  | Precipitação de proteínas com TCA 4%                                | Detectar a adição de soro                               | Imbert (1988)             |
| Fase reversa           | Zorbax Protein Plus       | a) 0,1% TFA em 15% CH <sub>3</sub> CN:2% isopropanol<br>b) 0,1% TFA em 55% CH <sub>3</sub> CN:2% isopropanol | 205 nm  | Leite em pó                  | Precipitação de proteínas com TCA 4%                                | Detectar a adição de soro                               | Imbert e Grenier (1990)   |
| Fase reversa           | Ultrabase C <sub>18</sub> | a) 0,1% TFA<br>b) 0,04% TFA em 60% CH <sub>3</sub> CN  | 214 nm  | Caseinato tratado com coalho | Precipitação de proteínas com TCA 12% (análise da fração insolúvel) | Fracionamento do caseinomacropéptideo livre de açúcares | Léonil e Mollé (1990)     |
| Fase reversa           | Vydac 218 TP 54           | a) 0,1% TFA<br>b) 0,02% TFA em 80% CH <sub>3</sub> CN  | 214 nm  | Leite tratado com coalho     | Inativação da enzima e precipitação das proteínas a pH 4,6          | Detectar o caseinomacropéptideo                         | Léonil e Mollé (1991)     |
| Intercâmbio catiônico  | Mono S HR 5/5             | 0-1,5 M NaCl em 20 mM KCl-HI   | 214 nm  | Leite tratado com coalho     | Inativação da enzima e precipitação a pH 4,6                        | Estudar a ação do coalho                                | Léonil e Mollé (1991)     |

Fonte: Adaptada de López-Fandiño e Ramos (1993)

## 2.6. Ocorrência de proteólise como fator interferente na pesquisa de soro em leite

É importante considerar a proteólise causada por microrganismos psicrotróficos, que podem estar presentes no leite, como um problema real, decorrido de sua granelização.

A proteólise no leite pode ocorrer devido a ação de enzimas nativas, como a plasmina; por enzimas adicionadas, principalmente durante a fabricação de queijos, como, por exemplo, a renina ou por enzimas produzidas pela microbiota presente, que pode contaminar o leite através de ordenha realizada em condições inadequadas de higiene ou pelos utensílios mal lavados utilizados durante a sua coleta ou por falta de hábitos higiênicos adequados por parte do ordenhador (Fukuda, 2003).

As proteases produzidas por bactérias psicrotróficas podem tornar o leite instável ao calor, provocar a coagulação durante a pasteurização, a geleificação do leite UAT, o desenvolvimento de vários sabores e odores indesejáveis, a redução do rendimento na produção de queijos e a ocorrência de textura anormal em alguns tipos de queijos (Pinto, 2004).

Algumas proteinases, principalmente as produzidas por *Pseudomonas fluorescens*, são termorresistentes, e, dependendo da sua concentração inicial no leite, podem degradar a  $\kappa$ -caseína, originando peptídeos com peso molecular semelhante ao do CMP (Alvim, 1992).

Alvim (1992) relatou que, a partir de 48h de estocagem a 4° C, o leite cru inoculado com *Pseudomonas fluorescens* (FTPT 0595) já apresentava ocorrência de reações proteolíticas, com conseqüente liberação de peptídeos com volume hidrodinâmico semelhante ao do CMP, correspondente à

adição de 0,8% de soro de queijo. A atividade proteolítica foi crescente, ao longo do período de estocagem, quando foi encontrado até 26% de indicativo de presença de soro, quando estocado a 10° C e inoculado com *Pseudomonas fragi* (FTPT 0596).

Segundo Alvim (1992), as enzimas produzidas pelos microrganismos do gênero *Mucor* possuem especificidade pela ligação 105-106 da  $\kappa$ -caseína, semelhante à da renina. Shammet *et al.* (1992), citados por Dracz (1996), estudaram a atividade proteolítica sobre a  $\kappa$ -caseína de algumas enzimas utilizadas para coagular o leite, como quimosina e enzimas originadas de *Mucor miehei* e da *Cryphonectria parasitica*. As análises por CLAE – fase reversa dos produtos da hidrólise revelaram que essas enzimas hidrolisam a  $\kappa$ -caseína de maneira diferente. Além da formação do CMP, observou-se uma extensa hidrólise não específica sobre a  $\kappa$ -caseína e para  $\kappa$ -caseinato no procedente do *M. miehei*.

Alvim (1992) não observou resultados que indicassem que bactérias usadas como fermentos lácticos são capazes de hidrolisar a  $\kappa$ -caseína na mesma ligação específica para a renina e interferir no método.

A Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003 (Ministério da Agricultura ..., 2003), oficializou a detecção de caseinomacropéptídeo (CMP) por cromatografia líquida de alto desempenho, método da filtração em gel como Método Analítico Oficial Físico-Químico para Controle de Leite e Produtos Lácteos.

Recentemente, foi publicada a Instrução Normativa nº 68, que tornou oficiais os métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários,

revogando a Instrução Normativa nº 22 (Ministério da Agricultura ..., 2006).

De acordo com a Instrução Normativa nº 69 (Ministério da Agricultura ..., 2006), somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto. Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30mg/L e 75mg/L este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos. Quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg/L, este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).

Em relação à Instrução Normativa nº 22 (Ministério da Agricultura ..., 2003), houve mudança no preparo da curva de calibração do equipamento de cromatografia, que passa a ser obtida com padrões de CMP ao invés de soro de queijo líquido. Isto torna o método mais seguro, eliminando a interferência da qualidade do leite utilizado na preparação deste soro de queijo. O resultado passou a ser expresso em concentração de CMP em mg/L, no lugar de porcentagem de soro.

## 2.7. O conservante bronopol

O bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) é um composto químico amplamente utilizado como antimicrobiano em cosméticos, medicamentos de uso externo, xampus e outros produtos de higiene devido ao seu poder bactericida (Wang *et al.*, 2002). Sua composição estrutural está ilustrada na Figura 4.

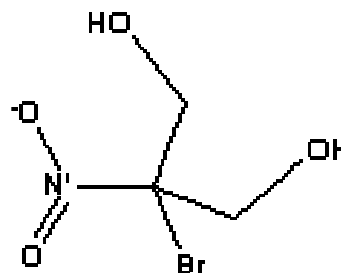


Figura 4 – Composição estrutural do bronopol  
Fonte: <http://www.wuzhouchem.com/cataloged/WWP/biocide/bronopol.gif>

Wang *et al.* (2002) desenvolveram uma técnica de separação por meio de CLAE – fase reversa para determinação de bronopol e seus produtos de degradação, e observaram que o melhor perfil cromatográfico é obtido quando a amostra é dissolvida em metanol. Foi utilizada coluna C18 com fase móvel de metanol/água/ácido ortofosfórico e detecção no comprimento de onda de 210 nm.

Portanto, é esperado que não haja interferência do bronopol na pesquisa de soro de queijo em leite por meio de CLAE – filtração em gel, com fase móvel de tampão fosfato e detecção no comprimento de onda de 205 nm.

A metodologia utilizada para se detectar misturas de leite de vaca, ovelha e cabra é baseada na composição em proteínas do leite. Pereira (2003) avaliou métodos eletroforéticos para detecção de fraudes pela adição de leite de vaca ao leite de cabra, e não observou diferenças entre amostras de leite cru com e sem adição do conservante bronopol.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta e preparo das amostras**

Foram coletadas seis amostras de leite cru provenientes de seis fazendas na região de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, nos meses de abril e maio de 2006. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária – UFMG, onde foram processadas.

Cada amostra, correspondente a dois litros de leite, foi subdividida em 45 alíquotas de 40 mL. Destas, 15 foram compostas de leite sem conservante e as outras 30 receberam, cada uma, um comprimido de bronopol. Foram testados, nos dois grupos, cinco níveis de adição de soro de queijo (0, 2, 5, 10 e 20%). No grupo do bronopol, foram testadas duas temperaturas de armazenamento (7 e 30° C) e, no grupo sem conservante, ou controle, as amostras foram congeladas. Todas as amostras foram armazenadas durante oito dias e analisadas no segundo, quarto e oitavo dias.

#### **3.2. Preparo do soro de queijo**

Foi adicionado 1 mL de coalho líquido (poder coagulante 1:3.000) da marca Ha-La em 500 mL de leite cru, de procedência e qualidade conhecidas, e colocado em banho-maria a 32°C. Após 60 minutos, a massa coagulada foi cortada, agitada e dessorada. O soro foi coletado em erlenmeyer de 500 mL e aquecido até princípio de fervura, visando a inativação da enzima do coalho (Ministério da Agricultura ..., 2003).

#### **3.3. Preparo da curva de calibração do equipamento de cromatografia**

Foi pesada uma alíquota de 20,00g de leite sabidamente isento de soro em béquer de 50 mL para a amostra branca. Foram pesadas alíquotas de 19,60; 19,00; 18,00 e 16,00g de leite isento de soro em béquer de 50 mL e acrescentadas alíquotas de 0,4; 1,0; 2,0 e 4,0g do soro de queijo a cada um deles, respectivamente. Obtendo-se, desta forma, os padrões de 0, 2, 5, 10 e 20% de soro adicionado.

Após a pesagem do leite e do soro, adicionou-se 10 mL de solução de ácido tricloroacético a 24%, sob agitação constante, em um intervalo de 2 minutos. Foi deixado em repouso por 60 minutos em temperatura ambiente e filtrado, em papel de filtro qualitativo, descartando as primeiras gotas (Ministério da Agricultura ..., 2003). Foram injetados 20 µL de cada filtrado no cromatógrafo (Shimadzu CLASS VP 6.1) com coluna (Zorbax GF 250 Bioséries da Agilent) cujo princípio de separação se baseia na exclusão molecular, com fluxo de fase móvel de 1,5 mL por minuto (bombeamento isocrático de solução tampão fosfato pH 6,0) e detecção por ultra-violeta no comprimento de onda de 205 nm. Foi construído o gráfico de porcentagem de soro *versus* a intensidade do sinal detector e calculada a reta de regressão aceitando valores de  $R \geq 0,95$ .

Este procedimento foi repetido a cada semana de análise, usando-se um leite de procedência e qualidade conhecidas (coletado na Fazenda Modelo da EV – UFMG em Pedro Leopoldo), de acordo com análises eletrônicas das amostras, realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite, pertencente à RBQL.

#### **3.4. Procedimento de análise**

Foram transferidos, com pipeta volumétrica, 10 mL de cada uma das amostras a serem analisadas para béquer de 50 mL. À amostra foram adicionados, com auxílio de bureta, 5 mL de solução de ácido

tricloroacético a 24%, sob agitação constante, em um intervalo de 2 minutos. Após repouso de 60 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo, tendo sido descartadas as primeiras gotas. Foram injetados 20 µL de cada filtrado no cromatógrafo com fluxo da fase móvel de 1,5 mL por minuto (Ministério da Agricultura ..., 2003).

### 3.5. Cálculos

O cromatograma da amostra foi comparado com o da curva de calibração, sendo identificado o pico com tempo de retenção semelhante. A porcentagem de soro na amostra foi calculada por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de soro, utilizando a seguinte equação, obtida pela injeção dos padrões da curva de calibração:  $y = ax + b$

Em que:  $x$  = concentração em % de soro

$y$  = altura do pico

$a$  = inclinação da reta

$b$  = intersecção com o eixo  $y$ ,

ou seja,

$$\% \text{ de soro} = \frac{\text{altura do pico} - b}{a}$$

### 3.6. Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com os tratamentos em esquema fatorial 5x3x3 e o cálculo do tamanho da amostra foi de acordo com Sampaio (2002).

Foi feita a estatística descritiva (médias e desvios-padrão) e os resultados foram comparados por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis, utilizando-se do *software* InfoStat da Universidade de Córdoba, Argentina.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de cada tratamento em função da porcentagem de soro de queijo adicionada estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações médias de soro, obtidas por CLAE, em amostras de leite adicionadas de cinco níveis de soro em função da adição ou não de conservante, e das temperaturas e tempos de armazenamento

| Tratamentos                       | Porcentagem de soro adicionado |                   |                   |                    |                    |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|                                   | 0 %                            | 2 %               | 5 %               | 10 %               | 20 %               |
| Controle, congelamento por 2 dias | -0,13 <sup>a</sup>             | 1,58 <sup>a</sup> | 4,74 <sup>a</sup> | 9,85 <sup>a</sup>  | 20,02 <sup>a</sup> |
| Controle, congelamento por 4 dias | -0,08 <sup>a</sup>             | 1,48 <sup>a</sup> | 4,49 <sup>a</sup> | 9,64 <sup>a</sup>  | 19,45 <sup>a</sup> |
| Controle, congelamento por 8 dias | -0,18 <sup>a</sup>             | 1,46 <sup>a</sup> | 4,48 <sup>a</sup> | 9,42 <sup>a</sup>  | 19,60 <sup>a</sup> |
| Bronopol, 7° C por 2 dias         | -0,10 <sup>a</sup>             | 1,62 <sup>a</sup> | 4,93 <sup>a</sup> | 10,07 <sup>a</sup> | 20,60 <sup>a</sup> |
| Bronopol, 7° C por 4 dias         | -0,11 <sup>a</sup>             | 1,76 <sup>a</sup> | 4,82 <sup>a</sup> | 10,17 <sup>a</sup> | 20,91 <sup>a</sup> |
| Bronopol, 7° C por 8 dias         | 0,05 <sup>a</sup>              | 1,78 <sup>a</sup> | 5,04 <sup>a</sup> | 10,34 <sup>a</sup> | 21,30 <sup>a</sup> |
| Bronopol, 30° C por 2 dias        | 0,24 <sup>a</sup>              | 2,06 <sup>a</sup> | 5,09 <sup>a</sup> | 10,47 <sup>a</sup> | 23,26 <sup>a</sup> |
| Bronopol, 30° C por 4 dias        | 0,80 <sup>a</sup>              | 2,26 <sup>a</sup> | 5,32 <sup>a</sup> | 10,39 <sup>a</sup> | 23,25 <sup>a</sup> |
| Bronopol, 30° C por 8 dias        | 1,67 <sup>a</sup>              | 2,98 <sup>a</sup> | 5,95 <sup>a</sup> | 11,18 <sup>a</sup> | 24,16 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Kruskal Wallis ( $p > 0,05$ )

De acordo com os dados contidos na Tabela 1, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos realizados, indicando que, amostras adicionadas de bronopol e armazenadas a 7 e 30° C por períodos de até oito dias, podem ser analisadas por CLAE

para detecção de soro de queijo em leite sem que ocorra alteração dos resultados esperados quando comparados com a recomendação do MAPA para o envio de amostras (congeladas e sem conservante).

Os resultados condizem com os encontrados por Leite (2006), que concluiu que amostras com conservante armazenadas a 30° C podem ser analisadas, quanto à contagem de células somáticas e composição centesimal até o quinto e quarto dia, respectivamente, após a coleta e que quando as mesmas são mantidas sob refrigeração este tempo se estende para dez dias.

Souza *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes quando as amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol, destinadas à contagem de células somáticas, foram armazenadas em temperaturas de 27, 32 e 36° C, por períodos de um, três, cinco e sete dias. Em temperaturas de 27 e 32° C os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa por até três dias de armazenamento, enquanto que a 36° C houve diferença nos resultados obtidos após o primeiro dia. Os autores também relatam que, amostras armazenadas sob refrigeração podem ser destinadas à análise de contagem de células somáticas por até sete dias após a coleta.

De acordo com Cassoli (2005), amostras adicionadas de bronopol armazenadas a 24° C podem ser analisadas, quanto à composição centesimal, até o quinto dia após a coleta, e as armazenadas a 7° C podem ser analisadas por até sete dias para composição centesimal e contagem de células somáticas.

Sanchez *et al.* (2005) armazenaram amostras de leite de cabra, adicionadas de bronopol, sob refrigeração durante 42 dias e não observaram diferenças nos teores de proteína e sólidos totais durante todo o período de estocagem.

Estes resultados indicam que no presente estudo não houve crescimento bacteriano nem produção de enzimas proteolíticas, o que causaria um aumento nos valores

encontrados, gerando resultados falso-positivos.

Outro fato a ser considerado é o perfil cromatográfico do conservante bronopol, que é detectado em coluna de fase reversa, em amostra dissolvida em metanol e utilizando-se fase móvel composta por metanol/água/ácido ortofosfórico. Portanto, não foi detectado no presente estudo, no qual se utilizou coluna de exclusão molecular, preparo da amostra com ácido tricloroacético e a fase móvel foi uma solução tampão fosfato com pH 6,0.

A substituição do congelamento da amostra pela adição do bronopol proporcionará maior facilidade às indústrias de laticínios que desejam monitorar a possibilidade da ocorrência de fraudes por adição de soro ao leite nas propriedades rurais. Este fato resulta em prejuízo às indústrias, pois estas pagarão ao soro adicionado, valores referentes ao pagamento do leite. Além disso, em caso de coleta de amostras e pesquisa da presença de soro no leite processado desta indústria por parte da Inspeção Federal, esta poderá ser autuada pelo MAPA por fraude.

A possibilidade de armazenamento das amostras adicionadas de bronopol, sob refrigeração ou em temperatura ambiente por até oito dias, é um achado importante, pois situações excepcionais, em que não é possível analisar as amostras imediatamente após a chegada das mesmas aos laboratórios, geram dificuldades na logística, tanto para as indústrias de laticínios como para os laboratórios. Deste modo, as amostras podem ser armazenadas em uma ampla faixa de temperatura por um período de tempo compatível com as necessidades de coleta, transporte aos laboratórios e procedimento de análise, sem comprometer a confiabilidade dos resultados (Gráfico 1, Gráfico 2, Gráfico 3 e Gráfico 4).

Gráfico 1 – Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado, adicionadas de 2% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30°C, durante oito dias de armazenamento

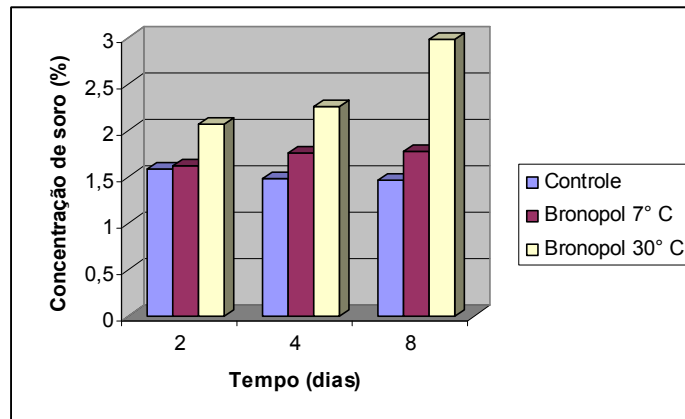


Gráfico 2 – Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado, adicionadas de 5% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30°C, durante oito dias de armazenamento

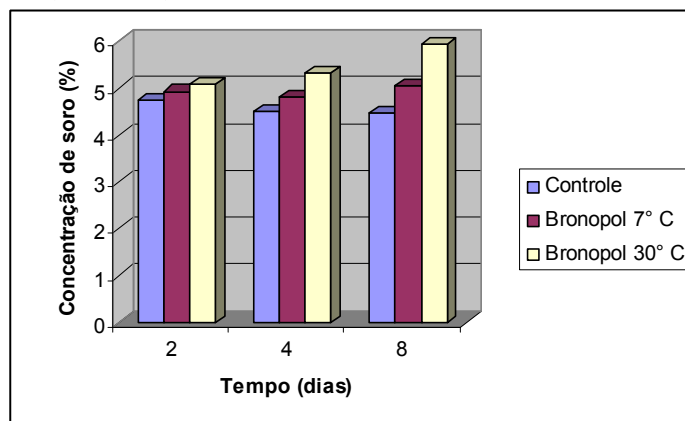


Gráfico 3 – Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado, adicionadas de 10% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30°C, durante oito dias de armazenamento

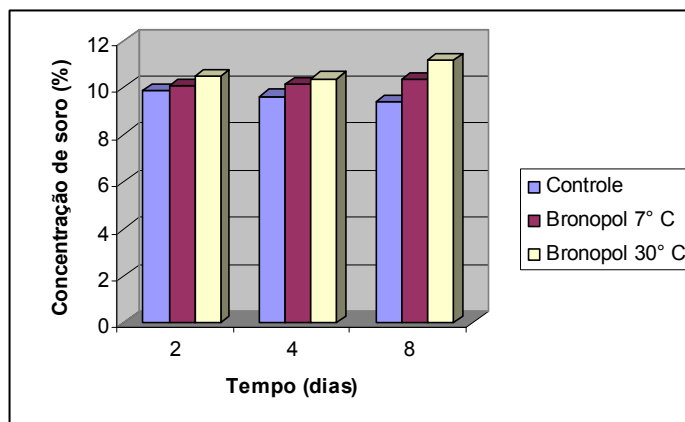
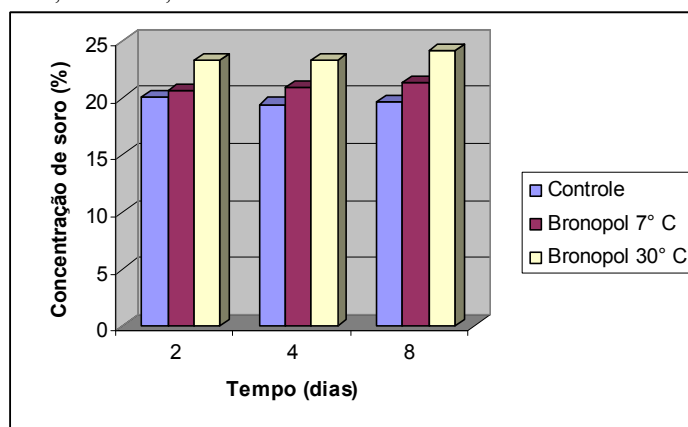


Gráfico 4 – Médias das concentrações de soro (%) em amostras de leite cru refrigerado, adicionadas de 20% de soro e mantidas sob congelamento, à 7 e 30°C, durante oito dias de armazenamento



Fukuda (2003), ao estudar o efeito do congelamento em leite cru e o leite UAT correspondente, observou um aumento dos valores obtidos entre o leite cru não congelado e o congelado por um dia, com tendência a redução no decorrer do armazenamento sob congelamento. Para o leite UAT foi observada uma tendência de queda suave e contínua.

Estes resultados são preocupantes, visto que parte das amostras analisadas no Brasil permanecem sob congelamento por extensos períodos de tempo, podendo chegar a alguns meses de armazenamento até o momento de análise das mesmas. Nessa situação, valores subestimados da concentração de soro em amostras de leite fraudadas podem ser detectados, prejudicando o consumidor.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho representam um ganho para a Inspeção Federal, para os laboratórios e para as indústrias de laticínios, pois permitem que seja utilizada para a pesquisa de soro de queijo em leite fluido, amostras de leite cru conservadas com bronopol em substituição ao congelamento.

## 5. CONCLUSÕES

É possível utilizar amostras de leite cru, conservadas com bronopol por até oito dias, na pesquisa de soro de queijo por meio da CLAE.

Amostras adicionadas de bronopol podem ser armazenadas por até oito dias a 7 e 30° C sem que ocorram alterações dos resultados obtidos na pesquisa de soro de queijo em leite por meio da CLAE.

## 6. CONSIDERAÇÃO FINAL

É necessário que se crie um Plano Nacional de Prevenção e Controle de Fraudes em Leite, ou que se adicione este requisito (ausência de fraude por adição de soro de queijo), nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Leite, pois, dessa forma seria criada uma rotina de coleta de amostras e análise, o que ajudaria a reduzir este tipo de fraude.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIS, C. *Science du Lait* (Principles des Techniques Laitieres). 4<sup>a</sup> ed., Edition Sepaic, Paris, 1984. 423p.

ALVIM, T. C. *Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho – filtração gélida*. 1992. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BENÍTEZ, E.; PONCE, P.; NOA, M. Detecção de suero de quesería em leite em polvo por HPLC de filtração por gel (GFC-HPLC). *Revista de Salud Animal*, v. 23, n. 1, p. 27-31, 2001.

BRASIL. Decreto nº 2244 de 04 de junho de 1997. Altera dispositivos do Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, alterado pelos Decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº 1.236, de 2 de setembro de 1994, e nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de junho de 1997, Seção I, p. 11555.

BRASIL. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências.

Disponível em:

<<http://www.mj.gov.br/DPDC/servicos/legislacao/cdc.htm>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2007.

CARTUYVELS, D.; MERCHIERS, M.; VAN RENTERGHEM, R.; DE BLOCK, J. A fast and simple method to determine the whey powder to milk powder ratio using spectroscopy in alkali. *Milchwissenschaft*, v. 54, n. 5, p. 268-272, 1999.

CASSOLI, L. D. *Validação da metodologia*

*de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru*. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP.

CHERNOVA, I. A.; SHATAEVA, L. K.; ABRASHAEVA, I.; VELCHEVA, P. Glycomacropéptide from k-casen as a substrate from neuraminidase. *Dairy Science Abstract*, v. 50, n. 3, p. 160, 1988.

CHIAPPINNI, C. C. J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação do soro de queijo quanto aos coliformes totais e coliformes fecais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, n. 292, v. 50 (1), p. 10-16, 1995.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: \_\_\_\_\_; BRAGA, G. L. *Introdução a métodos cromatográficos*. 3. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1988. Cap. 1, p. 13-33.

DE VILDER, J.; VAN RENTERGHERM, R.; WAES, G. Determination of rennet whey in sour cream and buttermilk. *Milchwissenschaft*, v. 43, p. 426-429, 1988.

DRACZ, S. *Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite*. 1996. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FUKUDA, S. P. *Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptideo e caseinomacropéptideo em leite*. 2003. 149f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FURTADO, M. A. M. *Desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite*

*pasteurizado*. 1989. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

FURTADO, M. A. M., WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Quantificação de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado através da determinação do número de caseína. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.43, n.260, p.3-11, 1988.

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v. 45, n. 4, p. 94-104, 1992.

IMBERT, A. GRENIER, J. Adulteration par du lactoserum presure des laits et des babeurres secs. Dosage des caséinomacropéptides A et B par CLMP. *Proc. XXIII International Dairy Congress (Montreal)*, 1, 208, 1990.

IMBERT, A. *Mise en evidence de l'adulteration éventuelle des poudres de lait et de babeurre par du lactosérum présure. Dosage des caséino macropéptides*. Documento de trabalho, CEE VI/3847/88, 1988.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*, n 62, p. 1149-1160, 1979.

LEITE adulterado vendido em Brasília. *Jornal do Brasil*, Brasília, 25 de abril de 2003. Disponível em: <<http://www.mj.gov.br/dpdc/clipping/2003/abril/250403.htm#Leite>>. Acesso em: 30 de março de 2005.

LEITE, M. O. *Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol*. 2006. 62f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola

de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LÉONIL, J., MOLLÉ, D. A method for determination of macropeptide by cation-exchange fast protein liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. *Journal of Dairy Research*, 58, p. 321-328, 1991.

LÉONIL, J.; MOLLÉ, D. Liberation of tryptic fragments from caseinomacropéptide of bovine k-casein involved in the platelet function. *Biochemistry Journal*, 271, p. 247-252, 1990.

LÓPEZ-FANDIÑO, R. RAMOS, M. Revisión: El caseinomacropéptido bovino. I. Características físico-químicas e atividade biológica. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. v. 32, n. 6, p. 575-588, 1992.

LÓPEZ-FANDIÑO, R. RAMOS, M. Revisión: El caseinomacropéptido bovino. II. Detección de la presencia de suero de quesería en productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. v. 33, n. 1, p. 1-12, 1993.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 de maio de 2003, Seção I, p. 3-25.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção,

Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 de setembro de 2002, Seção III.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 de dezembro de 2006, Seção I, p. 8.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado "Índice CMP", de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, 15 de dezembro de 2006, Seção I, p. 67.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Resolução nº 4, de 28 de junho de 2000. Institui o produto denominado "Manteiga Comum", para comercialização exclusiva no território nacional, que deverá atender, provisoriamente, às seguintes especificações de qualidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de julho de 2000, Seção I, p. 5.

MIRANDA, R. MPF denuncia quadrilha por fraude de leite. *Assessoria de Comunicação da PRPE*, Recife, 30 de março de 2004. Disponível em:

<<http://www.prpe.mpf.gov.br/internet/content/view/full/1869>>. Acesso em: 30 de março de 2005.

MONTÁÑEZ, C. D. A.; RAMÍREZ, J. R.; ARANGO, C. J. J.; BETANCOURT, S. D. P. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración com suero de quesería en leche deshidratada. *Veterinaria México*, v. 31, n. 3, p. 217-222, 2000.

MORR, C. V.; SEO, A. Fractionation and characterization of glycomacropéptide from caseinate and skim milk hydrolysates. *Journal of Food Science*, 53, p. 80-87, 1988.

MOTTAR, J.; VAN RENTERGHEM, R.; DE VILDER, J. Evaluation of the raw material for UHT milk by determining the degree of protein breakdown through HPLC. *Milchwissenschaft*, 40, p. 712-721, 1985.

OLIEMAN, C.; VAN DEN BEDEM, J. W. A sensitive HPLC method of detecting and estimating rennet whey total solids in skim milk powder. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v. 37, n. 1, p. 27-36, 1983.

OLIEMAN, C. VAN RIEL, J. A. M. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk with reversed-phase HPLC. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 43, p. 171-184, 1989.

PANETTA, J. C.; BARROS, V. R. M.; LAURENT, M. I.; MIGUEL, O.; ISIDORO, V. L. B. Fatores interferentes sobre a eficácia do método qualitativo utilizado para detecção de soro em leite de consumo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.42, n.253, p.26-33, 1987.

PEREIRA, D. B. C. *Utilização de técnicas de eletroforese em gel de poli(acrilamida) na identificação da adição de leite de vaca ao leite de cabra*. 2003. 124f. Dissertação



(Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PESQUISA detecta alto nível de soro no leite: Idec em ação: Governo acerta ao buscar qualidade e erra ao dividir fiscalização com empresas. *Folha de São Paulo*, 25 de fevereiro de 2003. Disponível em:

<[http://www.idec.org.br/noticia\\_imprimir.asp?id=1348](http://www.idec.org.br/noticia_imprimir.asp?id=1348)>. Acesso em: 30 de março de 2005.

PINTO, C. L. O. *Bactérias psicrotólicas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT*. 2004. 97f. Tese (“Doctor Scientiae”) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

POLAK, P.; BRADLEY JR., R. L. Quantitative detection of whey cream in sweet cream and butter. *Journal Of AOAC International*, v. 77, n. 2, p. 488-490, 1994.

POTGIETER, C. M. The detection of added whey powder in milk powder – 1. Investigation of the free sialic method recommended by the European Economic Community. *South African Journal of Dairy Technology*, v. 17, n. 2, p. 55-58, 1985.

RECIO, I.; LOPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; OLIEMAN, C.; RAMOS, M. Study of the formation of caseinomaclopeptides in stored ultra-high-temperature-treated milk by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 12, p.3845-3848, 1996.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora, 2002. 265p.

SANCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C. *et al.* Influence of storage and preservation on fossomatic cell count and composition of goat milk. *Journal of Dairy*

*Science*. v.88. p.3095-3100. 2005.

SHAMMET, K. M.; BROWN, R. J.; Mc MAHON, D. J. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 6, 1992.

SIQUEIRA, I. M. C. *Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de quatro tipos de soro de queijo*. 2000. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, E. M. T.; ARRUDA, S. F.; BRANDÃO, P. O.; SIQUEIRA, E. M. A. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 3, p.314-317, 2000.

SOUZA, G. N.; SILVA, M. R.; SOBRINHO, F. S. *et al.* Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.5, p.830-834, 2005.

SOUZA, L. J. *Nova Legislação Comentada de produtos lácteos: Revisada e Ampliada*. São Paulo: Revista Indústria de Laticínios, 2002, 327p.

TEIXEIRA, L. V. *Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do soro de queijos minas padrão e mussarela produzidos em quatro regiões de Minas Gerais*. 2005. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

URBÁN, G. C.; PÉREZ, N. F.; LEÓN, S. V.; FRESAN, C. O.; PÉREZ, J. R.; PRADO, G. F.; GONZÁLEZ, M. L.; GONZÁLEZ, C. C.; RAMÍREZ, A. A. Separacion por electroforesis (PAGE-SDS) del caseinomacropéptido liberado por

quimosina sobre la  $\kappa$ -caseína. Efecto de proteólisis por bacterias psicrótrofas. *Agrosur*, v. 26, n. 2, 1998.

URBÁN, G.; PÉREZ, N.; PÉREZ, J.; FRESÁN, C.; GONZÁLEZ, C.; VEJA, S.; GUTIÉRREZ, R.; DÍAZ, G. Detección de adulteración con suero de quesería en leches fluidas mexicanas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Revista Salud Animal*, v. 24, n. 1, p. 60-64, 2002.

VAN HOOYDONK, A. C. M.; OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, v. 36, n. 2, p. 153-158, 1982.

VAN RIEL, J. A. M.; OLIEMAN, C. Selective detection in RP-HPLC of Tyr-, Trp-, and sulfur-containing peptides by pulsed amperometry at platinum. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 21, p. 3911-3915, 1995a.

VAN RIEL, J.; OLIEMAN, C. Determination of caseinomacropeptide with capillary zone electrophoresis and its

application to the detection and estimation of rennet whey solids in milk and buttermilk powder. *Electrophoresis*, v. 16, n. 4, p. 529-533, 1995b.

VREEMAN, H. J.; VISSER, S.; SLANGEM, C. J.; VAN RIEL, J. A. M. Characterization of bovine  $\kappa$ -casein fraction and the kinetics of chymosin induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fraction determined by high-performance gel permeation chromatography. *Biochemistry Journal*, 240, p. 87-97, 1986.

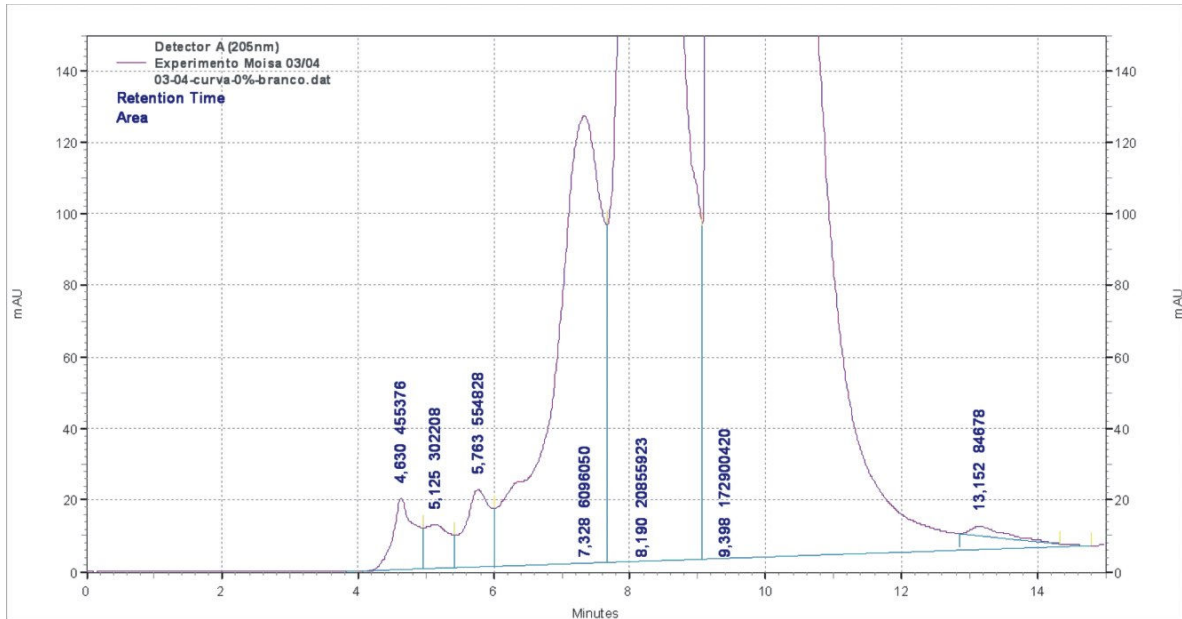
WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Dairy Chemistry and Physics*. John Wiley and Sons, New York, 1984, 467 p.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLWELL, K. Determination of bronopol and its degradation products by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.29, n.1-2, p.387-392, 2002.

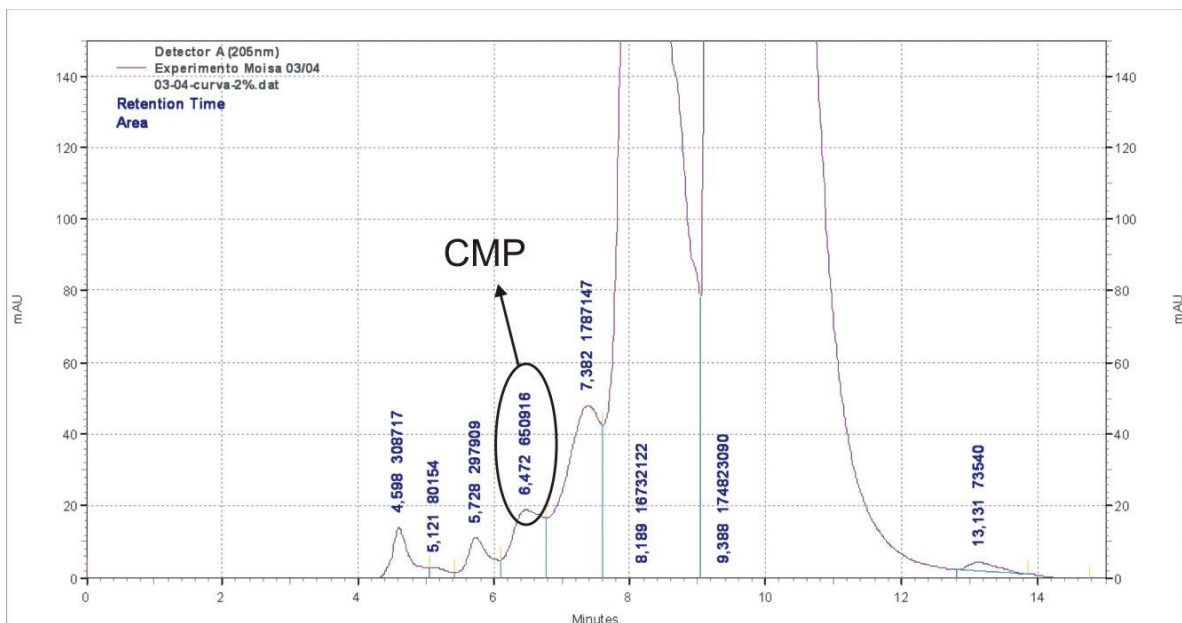
WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Adição de soro ao leite em pó – métodos de detecção. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.39, n.234, p.3-10, 1984.

## 8. ANEXOS

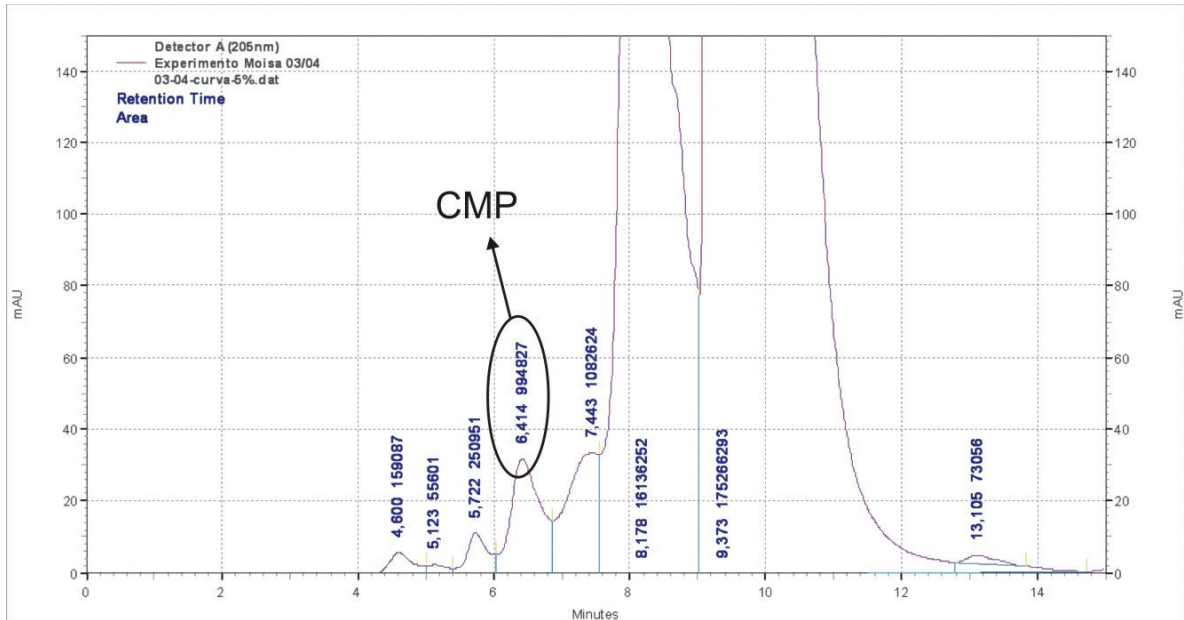
### 8.1 Cromatograma da curva de alibração (amostra branca)



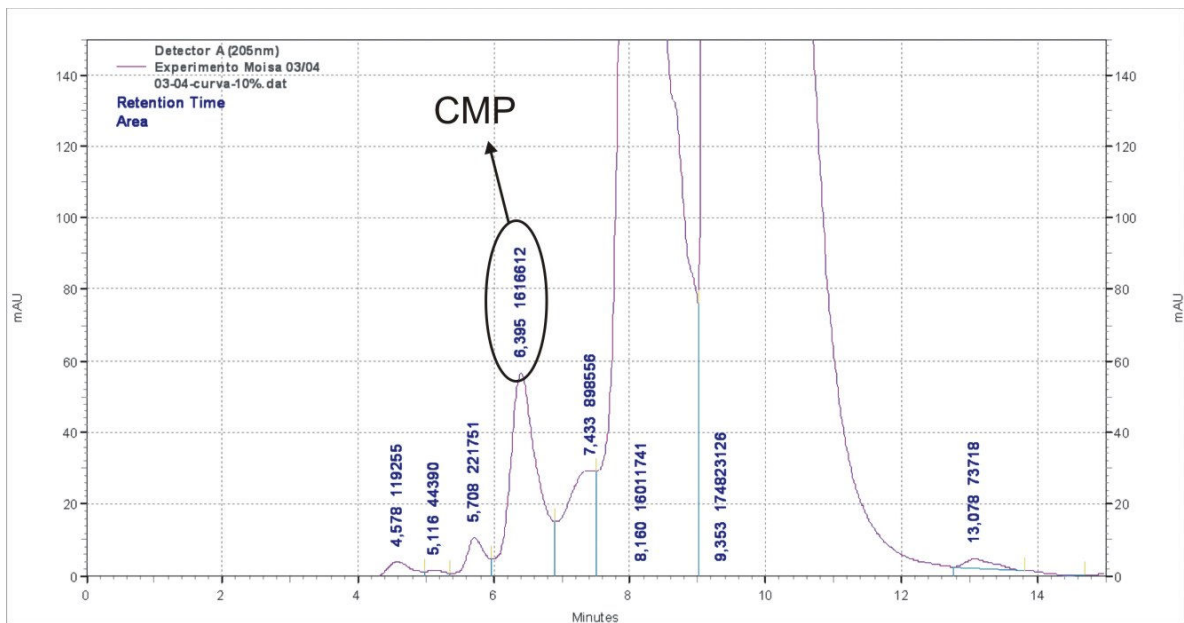
### 8.2 Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 2% de soro)



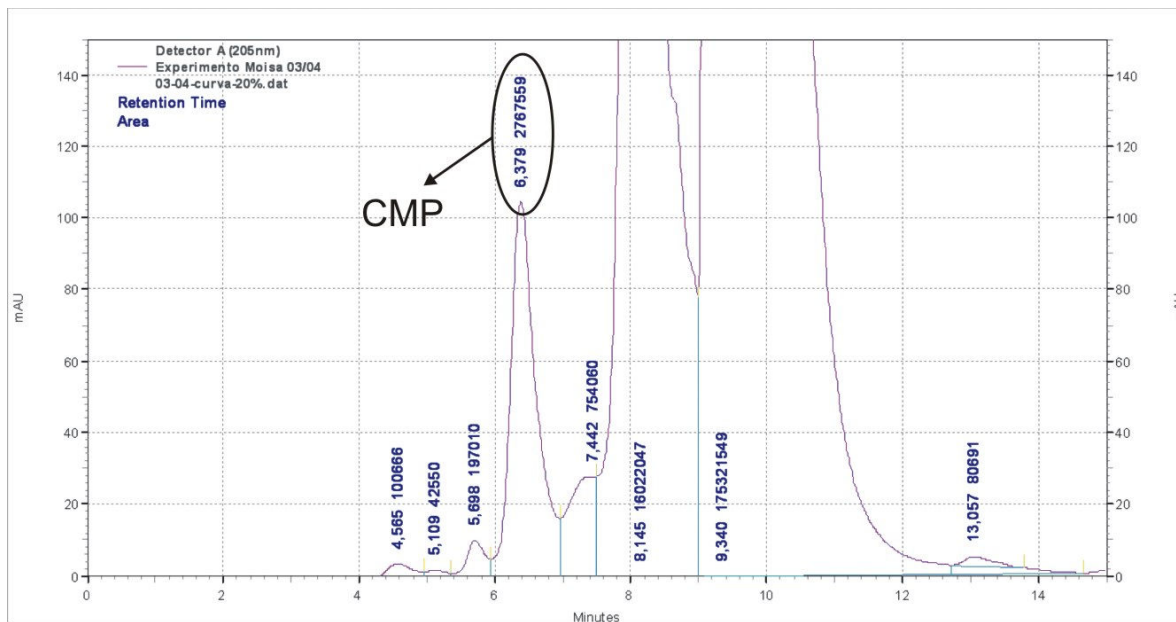
### 8.3 Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 5% de soro)



### 8.4 Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 10% de soro)



### 8.5 Cromatograma da curva de calibração (amostra padrão de 20% de soro)



## 8.6 Curva de regressão linear

### CURVA DE LEITE FLUIDO

Preparada e injetada no dia 03/04/2006

|        | LF (g) | Soro (g) | LT (g) | %Padrões | Altura | RT/min |
|--------|--------|----------|--------|----------|--------|--------|
| Branco | 20,53  | 0,00     | 20,53  | 0,000    | 0      | Nd     |
| 2%     | 19,59  | 0,40     | 19,99  | 2,001    | 19942  | 6,472  |
| 5%     | 19,01  | 0,99     | 20,00  | 4,950    | 32335  | 6,414  |
| 10%    | 18,03  | 1,99     | 20,02  | 9,940    | 57181  | 6,395  |
| 20%    | 16,01  | 3,99     | 20,00  | 19,950   | 104926 | 6,379  |

$$Y=AX+B \quad A= 5049,9740 \quad R^2= 0,9914$$

$$B= 5667,5206 \quad R= 0,9957$$

