

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**PESQUISA DA ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO AO LEITE  
PASTEURIZADO COMERCIALIZADO EM MINAS GERAIS:  
DETERMINAÇÃO DE CMP POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA  
DE ALTA EFICIÊNCIA (CLA) E COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS  
IMUNOQUÍMICOS (STICK cGMP e BRW ELISA)**

Paula Rita Lobato

**Belo Horizonte  
UFMG-EV  
2014**



**PAULA RITA LOBATO**

**PESQUISA DA ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO AO LEITE PASTEURIZADO  
COMERCIALIZADO EM MINAS GERAIS: DETERMINAÇÃO DE CMP POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLA) E  
COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS IMUNOQUÍMICOS (STICK cGMP e BRW  
ELISA)**

**Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção de grau de Mestre  
em Ciência Animal.**

**Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de  
Produtos de Origem Animal**

**Orientador: Leorges Moraes da Fonseca**

**Belo Horizonte – MG  
Escola de Veterinária da UFMG  
2014**

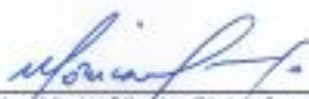
L796p Lobato, Paula Rita, 1987-  
Pesquisa da adição de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais: determinação de CMP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLA) e comparação dos métodos imunológicos (Stick cGMP e BRW Elisa) / Paula Rita Lobato. – 2014.  
41 p. : il.

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

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Adulteração e inspeção – Teses. 3. Soro de queijo – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida e aprovada em 28 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Mônica Maria Oliveira Pinho-Cerqueira  
Presidente



---

Prof. Leorges Moraes da Fonseca  
Orientador



---

Prof. Lara Macedo Bonfim  
PUC - Betim



---

Prof. Mônica de Oliveira Leite  
Escola de Veterinária de UFMG

*“Se você pode sonhar, você pode realizar.”*

Walt Disney



---

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus, por me dar sabedoria, oportunidade de viver, paciência e fôlego de vida a cada dia. E por ter permitido chegar até aqui.

Aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e minha irmã Roberta pelo carinho e atenção.

Aos meus familiares pelo carinho e confiança no meu trabalho, em especial a minha querida vizinha Maria Geralda pelas palavras sábias e motivadoras.

Ao meu orientador, Leorges Moraes da Fonseca, pelos ensinamentos, confiança, paciência e compreensão.

A todos os mestres que já passaram na minha vida e que de alguma forma deixaram o seu saber. Professora Lara Macêdo e Professor Eduardo Xavier por terem despertado o interesse e amor pela Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Professora Mônica Pinho pelos conselhos e ensinamentos e Professora Cláudia pela presteza e atenção.

Aos funcionários do DTIPOA, Maura e Marco Antônio pela disponibilidade em me ajudar. Aos funcionários do Lab-UFGM, principalmente Taynara, Rose e Débora, pela boa vontade, educação e paciência.

À Márcia Eliza por toda sua paciência, dedicação e preocupação, sua ajuda foi fundamental durante todo o trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do SENAI, que de alguma forma contribuíram para concretização desse trabalho, pelos conselhos, apoio, presteza e ajuda.

À Cristiane Conti e meu Gerente Gerson Wilson pela compreensão.

A todas minhas amigas que de alguma forma sempre se fizeram presentes.

Aos meus colegas Felipe e Guilherme por me orientarem e guiarem nos momentos de desespero.

Ao meu namorado Guilherme pela paciência, apoio e motivação.

Ao Filipe, que se dispôs a ensinar e ajudar na parte estatística do meu experimento.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Obrigada!



---

## SUMÁRIO

---

	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	08
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	09
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	11
	<b>RESUMO</b> .....	12
	<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	Leite e mercado.....	13
2.2	Composição do leite.....	14
2.3	Fraudes em leite.....	14
2.4	Soro lácteo.....	15
2.5	$\kappa$ -caseína e caseinomacropéptido (CMP).....	16
2.6	Métodos oficiais de detecção de fraude por adição de soro de queijo ao leite.....	17
2.6.1	<i>Método da dosagem do ácido siálico</i> .....	17
2.6.2	<i>Cromatografia</i> .....	18
2.7	Outros métodos para detecção de soro de queijo ao leite.....	21
2.8	Proteólise como fator interferente na pesquisa de soro em leite.....	21
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1	Procedimento cromatográfico.....	22
3.1.1	<i>Coleta das amostras</i> .....	22
3.1.2	<i>Análise de CMP</i> .....	22
3.1.3	<i>Preparo da curva de calibração</i> .....	22
3.1.4	<i>Preparo das amostras</i> .....	23
3.1.5	<i>Análise quantitativa</i> .....	24
3.1.6	<i>Análise estatística</i> .....	24
3.2	Análises físico-químicas.....	24
3.2.1	<i>Análise estatística</i> .....	24
3.3	Avaliação dos métodos BRW Elisa e Stick cGMP para determinação e detecção do CMP no leite.....	24
3.3.1	<i>Preparo das amostras</i> .....	24
3.3.2	<i>Análises cromatográficas</i> .....	24
3.3.3	<i>Análise por meio do método BRW Elisa</i> .....	24
3.3.4	<i>Análise por meio do método Stick cGMP</i> .....	24
3.3.5	<i>Análise estatística</i> .....	24
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
4.1.	Diagnóstico da fraude por adição de soro de queijo ao leite nas Mesorregiões de Minas Gerais.....	26
4.1.1	<i>Fraude por adição de soro de queijo ao leite pasteurizado e Sistema de Inspeção</i> .....	30
4.1.2	<i>Fraude por adição de soro de queijo ao leite e tipo de empresa</i> .....	32
4.2	Correlação das características físico-químicas e índice de CMP nas amostras comerciais de leite pasteurizado.....	34

4.3	Comparação dos métodos Stick cGMP, BRW Elisa e CLAE-FG.....	36
5.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
6.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Comparação da composição do soro doce e soro ácido.....	16
Tabela 2 -	Tabela das médias de CMP por mg/L das amostras de leite pasteurizado acima de 75mg/L das mesorregiões de Minas Gerais.....	28
Tabela 3 -	Níveis médios de CMP em amostras de leite pasteurizado por mesorregiões de Minas Gerais.....	29
Tabela 4 -	Distribuição das amostras de leite pasteurizado em relação às mesorregiões de Minas Gerais e o tipo de inspeção.....	32
Tabela 5 -	Média e Desvio-padrão das análises físico-químicas (proteína, gordura, acidez titulável, pH, densidade e crioscopia) das amostras de leite pasteurizado coletadas em MG.....	34
Tabela 6 -	Média e Desvio-padrão das análises físico-químicas (proteína, gordura, acidez titulável, pH, densidade e crioscopia) das amostras de leite pasteurizado por mesorregiões de MG.....	34
Tabela 7 -	Coefficiente de correlação de Spearman entre as variáveis de composição centesimal de amostras de leite pasteurizado.....	35

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	Corte transversal da micela de caseína. (A: submicela, B: cadeias protéicas, C: fosfato de cálcio, D: kappa casein, E: grupos fosfato).....	17
Figura 2 -	Fitas com resultados positivos e negativos para GMP. C – azul linha de controle, e T - linha de teste vermelho. As setas referem-se à extremidade da fita que é mergulhada na solução de amostra.....	20
Figura 3 -	Mapa das mesorregiões de Minas Gerais.....	23
Figura 4 -	Cromatógrafo utilizado para determinação do índice de CMP (mg/L).....	23
Figura 5 -	Curva padrão já calculada equação da reta de regressão com valor destacado em vermelho de $r > 0,95$ .....	23
Figura 6 -	Esquema analítico para análise de determinação quantitativa de CMP em amostras de leite pasteurizado pelo BRW Elisa.....	25
Figura 7 -	Esquema analítico para análise de determinação qualitativa e semi-quantitativa de GMP em amostras de leite pasteurizado pelo Stick cGMP.....	25
Figura 8 -	Percentual de amostras de leite pasteurizado coletadas por mesorregiões de Minas Gerais.....	26
Figura 9 -	Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas em relação ao índice de CMP estipulado pela Legislação (IN n°69/2006).....	26
Figura 10 -	Percentual total de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE-FG em relação ao índice de CMP estipulado pela Legislação (IN n°69/2006) por mesorregiões de Minas Gerais.....	28
Figura 11 -	Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE e tipo de inspeção no estado de Minas Gerais (n= 56) .....	30
Figura 12 -	Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE em relação ao índice de CMP e tipo de inspeção .....	31
Figura 13-	Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE em relação ao tipo de empresa em Minas Gerais (n=56).....	33
Figura 14 -	Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE em relação ao índice de CMP e tipo de empresa (n=56).....	33
Figura 15-	Amostras de leite pasteurizado analisadas pelos métodos cromatográficos (CLAE) e imunoquímicos (Stick c-GMP e BRW Elisa) no estado de Minas	36

Gerais (n=18).

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

µL	Microlitro
mg	Miligrama
AFT	Ácido Fosfotúngstico
BRW	Soro de Queijo Bovino (Bovine rennet whey)
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
cGMP	Caseinoglicomacropéptido
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FG	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Filtração em Gel
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
CMP	Caseinomacropéptido
CSC	Cromatografia Supercrítica
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Inibitório
UE	União Europeia
GMP	Glicomacropéptido
IN	Instrução Normativa
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NANA	Ácido N-Acetilneuramínico
NIR	Near infrared – Infravermelho Próximo
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PS/PT	Proteínas de Soro/Proteína Total
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SF	Sem Fiscalização
TCA	Ácido Tricloroacético
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHT	“Ultra High Temperature”
UV-4 <sup>a</sup> -DS	Ultravioleta Visível-Espectro de Absorção Derivada da Quarta

## RESUMO

O soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios de elevado valor nutritivo. No entanto, devido ao seu baixo valor comercial, a sua utilização para adulterar leite é uma prática conhecida e de difícil detecção. A determinação do índice de caseinomacropéptido (CMP) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com filtração em gel (CLAE-FG) é usada oficialmente no Brasil para investigar adição de soro de queijo ao leite. Este índice não deve ser superior a 30 mg/L. Se o índice de CMP for de 30 a 75 mg/L, o leite pode ser utilizado apenas para os produtos lácteos específicos e, acima de 75 mg/L, somente para a alimentação animal. O objetivo deste estudo foi avaliar o índice de CMP por CLAE-FG para detectar adição fraudulenta de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado em Minas Gerais, estado responsável por cerca de 30% da produção de leite brasileira. Cinquenta e seis amostras de leite foram coletadas de forma aleatória em estabelecimentos varejistas das regiões Metropolitana, Centro-Oeste, Noroeste, Zona da Mata, Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Sul de Minas e mantidas sob congelamento até a análise no Laboratório de Cromatografia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. Apenas 68,0% das amostras estavam em conformidade com a norma, com índices em até 30 mg/L. Em 2,0% das amostras o índice de CMP variou entre 30 e 75 mg/L e em 30,0% das amostras estava acima de 75 mg/L. Também foi avaliada a eficácia dos métodos imunológicos (Stick cGMP e BRW Elisa) comparada a CLAE. Os mesmos apresentaram resultados satisfatórios como testes de triagem. A determinação rotineira do índice de CMP por CLAE ou métodos imunológicos pode desempenhar um papel importante para monitorar e coibir a adição fraudulenta de soro de queijo ao leite pasteurizado.

**Palavras-chaves:** CMP, cromatografia, fraude, soro de queijo.

## ABSTRACT

Cheese whey is a nutritious by-product from dairy industries. However, due to low commercial value and difficulty of detection, it is frequently used to adulterate milk. In Brazil, the caseinomacropéptide (CMP) determination by gel filtration high performance liquid chromatography (HPLC) is the official method to investigate cheese whey addition to the milk. CMP concentration is supposed to be equal or less to 30 mg/L. If CMP content ranges from 30 to 75 mg/L, the milk should be used only for specific dairy products, and if the level is higher than 75 mg/L, the milk shall be used strictly for animal feeding. The objective of this study was to evaluate the level of CMP by HPLC to detect fraudulent addition of cheese whey to the pasteurized milk, in the Minas Gerais state. Fifty six samples of milk were collected from retailers located in six regions of Minas Gerais State, Brazil, and kept under refrigeration until analysis. Only 68 percent of the samples were in compliance with the legal requirements of CMP up to 30 mg/L. Two percent of the samples presented CMP levels from 30 to 75 mg/L and 30 percent of the samples showed levels of CMP higher than 75 mg/L. Immunochemical methods (Stick cGMP and BRW Elisa) were compared to HPLC, without significant difference ( $p>0.05$ ) among the methods. Milk quality inspection through CMP monitoring by HPLC or immunochemical methods is an important tool to minimize or prevent milk adulteration with cheese whey.

**Keywords:** CMP, cheese whey, chromatography.

## 1. INTRODUÇÃO

Considerando a importância do leite e derivados na alimentação humana e que seu consumo cresce em todo o mundo, é importante assegurar a qualidade e integridade destes alimentos, bem como o controle de eventuais fraudes. Diante disso, a qualidade do leite tem sido alvo de estudos, sendo influenciada diretamente pela forma de obtenção e armazenamento do leite recém ordenhado e por toda a cadeia de transporte, processamento e consumo. É impossível para a indústria obter produtos de qualidade a partir de leite cru que não atenda aos requisitos mínimos de composição, contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS), entre outras (FIRMINO *et al.*, 2010). Por isso, parâmetros são estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para que haja maior controle da matéria-prima e de produtos do setor laticinista, buscando melhorias para o mercado interno e maior inserção dos produtos lácteos brasileiros no mercado internacional (BRASIL, 2006).

Das adulterações que ocorrem ao leite, a adição de soro de queijo merece destaque, pois como este é um componente do próprio leite a sua detecção se torna difícil (FREITAS *et al.*, 2011). A fraude com soro de queijo é comum, fácil de ser realizada e sua detecção só é possível por testes laboratoriais caros (PESQUISA..., 2003). Além disso, ela pode ser mascarada pela adição de outros ingredientes como sacarose e cloreto de sódio, o que pode resultar em alguns valores analíticos aparentemente normais (FIRMINO *et al.*, 2010). Esta fraude é facilitada pelo baixo valor comercial do soro, relativamente pequeno aproveitamento em produtos lácteos e dificuldade de detecção da fraude (FRIEDRICH *et al.*, 2010).

Os prejuízos relacionados com fraudes vão desde redução do rendimento, diminuição do valor nutricional, alteração da qualidade dos produtos beneficiados, diminuição da vida de prateleira, além do risco à saúde dos consumidores pela possível presença de determinadas substâncias potencialmente perigosas (CORTEZ *et al.*, 2010).

Alguns produtos como creme de leite, leites fermentados, e alguns tipos de queijo podem conter soro em suas formulações (BRASIL, 2007), enquanto em outros produtos, como bebidas lácteas, a sua utilização é permitida desde que conste em rotulagem específica e os limites sejam obedecidos. A legislação brasileira estabelece que o leite pasteurizado, esterilizado e em pó não podem conter adição de soro de queijo.

A fraude por adição de soro de queijo ao leite pode ser detectada pela análise do índice de caseinomacropéptido (CMP), uma porção hidrofílica da  $\kappa$ -caseína, liberada durante a coagulação do leite, pela ação da quimosina. Entretanto, a ação de proteases produzidas por micro-organismos psicrotróficos pode ter como consequência a ocorrência de resultados falsos positivos.

Existem diversas técnicas para detecção de adição de soro de queijo ao leite, o teste oficial e aprovado pelo MAPA é o do método de determinação do índice de CMP no leite utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Este método é sensível e rápido, porém requer mão de obra qualificada e equipamentos sofisticados, tornando-se um método de alto custo (CARVALHO *et al.*, 2007a; FUKUDA, 2004; MAGALHÃES, 2008).

Outros métodos de triagem são disponíveis para a detecção de soro em leite, incluindo os métodos imunoquímicos, a exemplo do Stick c-GMP e o BRW (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Todavia, estes métodos são utilizados sem comprovada eficácia em amostras de leite pasteurizado e não há relato de estudos no Brasil.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência de fraude por adição de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado em algumas regiões do estado de Minas Gerais e avaliar os métodos imunoquímicos disponíveis comercialmente para a detecção de CMP no leite.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leite e mercado

O Brasil é o 4º produtor mundial de leite (SIQUEIRA *et al.*, 2013). Segundo dados do



Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a aquisição de leite nacional no ano de 2012 foi de 22,338 bilhões de litros gerando um aumento de captação de 32,5% sobre a quantidade obtida em 2011. Já a industrialização do leite teve aumento de 2,6% no comparativo entre os anos de 2011 e 2012. Quanto à origem do estabelecimento, 92,5% atuam sob inspeção sanitária federal, 6,8% estabelecimentos atuam sob inspeção estadual e 0,7% com inspeção municipal (IBGE, 2013).

O estado de Minas Gerais é o principal produtor brasileiro de leite e se destaca como um dos principais geradores de renda e produtos, além de possuir o maior rebanho de vacas em lactação (FONSECA; ZOCCAL, 2009). É também o estado que mais adquire leite (25,6%), seguido por Rio Grande do Sul (15,4%) e Paraná (11,7%) (IBGE, 2013).

O estado é subdividido em 12 mesorregiões, sendo estas: Campo das Vertentes, Central Mineira, Jequitinhonha, Metropolitana de Belo Horizonte, Noroeste, Norte, Oeste, Sul/Sudoeste de Minas, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce e Zona da Mata. No período de 2008, o Triângulo Mineiro e o Alto Paranaíba foram considerados os maiores produtores de leite, com cerca de 1,8 bilhão de litros, seguidos pela região Sul e Sudoeste com 1,3 bilhão de litros anualmente. A Zona da Mata mineira encontra-se em terceiro lugar com 762 milhões de litros. Nesse período o Jequitinhonha, foi a única mesorregião que reduziu a quantidade produzida em 37% (FONSECA; ZOCCAL, 2009).

## 2.2. Composição do leite

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 (BRASIL, 2007). O leite é considerado um alimento praticamente completo e versátil, pois além de ser rico em proteínas e possuir funções nutritivas altamente benéficas à saúde, é também

utilizado pelas indústrias lácteas para fabricação de vários produtos e subprodutos derivados.

O leite possui em média 3,5% de proteínas, 3,8% de gordura, 5,0% de lactose, 0,7% de minerais (cinzas) e 87% de água. Esses valores médios podem apresentar desvios, sendo a gordura o componente mais variável (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado contido na Instrução Normativa nº 62 do MAPA (BRASIL, 2011), o leite pasteurizado deve atender os requisitos físico-químicos de gordura (mínimo de 3 g/100 g) para leite integral, densidade relativa a 15°C (1,028 a 1,034), acidez titulável (0,14 a 0,18 g de ácido láctico/100 mL), extrato seco desengordurado (mínimo de 8,4 g/100 g), índice crioscópico (-0,512°C a -0,531°C) e proteína (mínimo de 2,9 g / 100 g). Esses parâmetros físico-químicos do leite podem ser alterados pela ação de micro-organismos, por fraudes do produto, pela fase de lactação, pelo intervalo entre as ordenhas, alimentação, por fatores genéticos do animal, etc (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

## 2.3. Fraudes em leite

O aumento da produção e captação de leite no Brasil continua associado à crescente produção de queijos com o concomitante aumento na produção do soro do leite, que é rico em proteínas e lactose.

A autenticidade e qualidade dos alimentos é um problema mundial por razões econômicas e até mesmo de saúde pública. O leite particularmente é um produto susceptível a fraudes, o que pode acarretar vários problemas, pois além de lesar o consumidor, que julga estar adquirindo um produto íntegro, o consumo principalmente por crianças em fase de crescimento pode levar a consequências nutricionais danosas (FREITAS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2009; VELOSO, 2002).

Para proteger o consumidor de possíveis fraudes foi sancionada a Lei Federal nº8.078 de 11/09/1990, dispondo que são impróprios ao uso e consumo os produtos deteriorados,

alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, perigoso ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação (BRASIL, 1990).

Os prejuízos relacionados com fraudes vão desde redução do rendimento, diminuição do valor nutricional, alteração da qualidade dos produtos beneficiados, diminuição da vida de prateleira, além do risco à saúde dos consumidores pela possível presença de determinadas substâncias potencialmente perigosas (CORTEZ *et al.*, 2010).

Segundo Freitas *et al.* (2011), “Entende-se por falsificação a adição ou subtração parcial ou total de qualquer substância na composição de um produto”. De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), considera-se fraudado, adulterado ou falsificado o leite que: 1) for adicionado de água; 2) tiver sofrido subtração de qualquer dos seus componentes, exceto a gordura; 3) for adicionado de substâncias conservadoras ou quaisquer elementos estranhos à sua composição; 4) for de um tipo e se apresentar rotulado como de outro de categoria superior; 5) estiver cru e for vendido como pasteurizado; 6) for exposto ao consumo sem as devidas garantias de inviolabilidade (BRASIL, 2007). Outras exceções foram acrescentadas em Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade posteriormente editados, como subtração de gordura em outras categorias de leite.

O leite pasteurizado era classificado em “A”, “B” ou “C” de acordo com as características específicas do processamento, com a Instrução Normativa nº51 do MAPA o leite tipo C, passou a ser chamado unicamente de “leite pasteurizado” (BRASIL, 2002). Dentre as adulterações que ocorrem em leite fluido e produtos lácteos, as mais comuns incluem: mistura de leite de espécies diferentes para produção de queijo (em queijos produzidos a partir de leite de ovelha, cabra ou búfala), incorporação das

proteínas do soro ao queijo para aumentar rendimento de produção e adição de água, soro de queijo ou leite ao leite (MAFUD *et al.*, 2007; VELOSO, 2002). Dessas, a adição de soro de queijo ao leite fluido merece destaque, pois por este ser um componente do próprio leite, a sua detecção se torna difícil (FREITAS *et al.*, 2011). Além disso, os métodos de análises para detecção desta fraude são onerosos, requerem equipamentos específicos, de alto custo de implantação e que necessitam de mão de obra capacitada para realização das análises.

De acordo com Cortez *et al.* (2010), apesar da crioscopia se mostrar um método eficiente para detectar adição de água ao leite, mesmo em pequenas concentrações, esta técnica falha em casos em que a água é adicionada misturada com outros componentes, como os presentes no soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. A análise sensorial também não é um método confiável para a determinação da maioria das fraudes.

#### **2.4. Soro lácteo**

De acordo com o RIISPOA, entende-se como “soro de leite” o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite, destinado a fabricação de queijos e caseína (BRASIL, 2007). O soro lácteo é a porção aquosa que se separa do coágulo e que corresponde em torno de 85-90% do volume de leite utilizado para a fabricação de queijos, sendo um subproduto que contém em torno de 55% dos nutrientes do leite, rico em proteínas além de água, lactose e minerais.

De acordo com o seu grau de acidez, o soro lácteo é classificado em soro ácido e soro com baixa acidez (soro doce). Queijos coagulados principalmente pelo uso de renina resultam em soro com baixa acidez (soro doce), enquanto queijos que utilizam acidificação como importante parte do processo de coagulação e fabricação de caseínas, resultam em soro ácido. A composição dos soros citados acima encontram-se na Tabela 1.



Tabela 1: Comparação da composição do soro doce e soro ácido.

Componente	Soro Doce (%)	Soro Ácido (%)
Água	93-94	94-95
Sólidos Totais	6-7	5-6
Lactose	4,5-5	3,8-4,2
Nitrogênio não protéico (% do N total)	22	27
Proteína (N x 6,38)	0,8-1	0,6-1
Ácido Lático	0,1-0,2	0,7-0,8
Cinzas	0,5-0,7	0,7-0,8

Fonte: Carvalho *et al* (2007a).

As principais proteínas presentes no soro de leite são:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina e outras, incluindo as imunoglobulinas. A adição de derivados das proteínas do soro a outros alimentos pode conferir melhorias nas qualidades funcionais e nutricionais, além do uso de proteínas, hidrolisadas ou não, como suplementos alimentares ou pela indústria farmacêutica (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O grande volume de soro gerado pela fabricação de queijos tem sido um desafio, uma vez que a maioria desse soro não é aproveitada pela indústria, e o descarte deste no meio ambiente, sem um tratamento prévio, é proibido por resultar em graves problemas de poluição. O soro é constituído principalmente por carboidratos e 20% do total protéico do leite integral, componentes responsáveis por sua elevada demanda biológica de oxigênio (DBO), que está entre 30.000 e 50.000 mg.L<sup>-1</sup>. A lactose é a principal responsável por estes altos valores, já que as proteínas são responsáveis por apenas 10.000 mg.L<sup>-1</sup> de DBO (MAWSON, 1994). Uma fábrica com produção média de 10.000 L de soro por dia, polui o equivalente a uma população de 5.000 habitantes. Por isso, quando descartado como resíduo industrial, o soro de leite é considerado como um sério problema ambiental.

Segundo Tremarin (2007), no Brasil, o lançamento dos efluentes das indústrias de laticínios diretamente nos cursos d'água, sem qualquer tratamento prévio, ainda é comum. Entretanto, essa é uma prática cada vez menos frequente, devido a uma maior atuação dos órgãos ambientais.

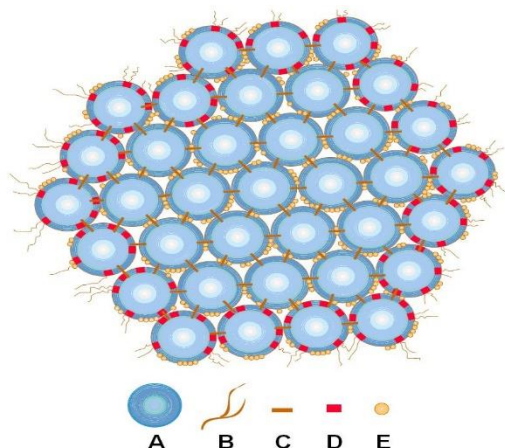
A recuperação dos nutrientes do soro e a sua transformação em compostos de maior valor agregado é uma boa alternativa para à redução do efeito poluidor. A matéria orgânica presente no soro pode ser aproveitada de várias formas, a exemplo das proteínas que podem ser recuperadas por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar, entre outras aplicações. A lactose pode ser cristalizada e comercializada pura, ou fermentada para produzir etanol ou ácidos orgânicos, ou ainda hidrolisada para produzir glicose e galactose (LEITE, 2006).

## 2.5. $\kappa$ -caseína e caseinomacropéptido (CMP)

As caseínas constituem um grupo de fosfoproteínas específicas do leite e estão arranjadas em forma de micelas, as quais consistem em estruturas esféricas com o ponto isoelétrico em pH 4,6. As micelas de caseínas (Figura 1) apresentam duas regiões distintas que são constituídas de  $\alpha$  e  $\beta$  caseínas (parte hidrofóbica), e  $\kappa$ -caseína (parte hidrofílica), além de alguns sais do leite como fosfato de cálcio, magnésio e citrato. Os principais fatores que afetam a estabilidade das micelas de caseína são a

hidrólise enzimática da  $\kappa$ -caseína, a temperatura, o pH, o excesso de  $\text{Ca}^{+2}$  e adição de etanol (DAMODARAN.; PARKIN.; FENNEMA, 2010).

Figura 1: Modelo da micela de caseína (A: submicela, B: cadeias protéicas, C: fosfato de cálcio, D: kappa caseína, E: grupos fosfato).



Fonte: PROTEÍNAS do Leite. Disponível em: <<http://www.food-info.net/images/caseinmicelle.jpg>>. Acesso em: 10 fev. 2014

Segundo Walstra e Jenness (1984), citado por Andrade (2010), a  $\kappa$ -caseína consiste na fração mais solúvel das caseínas na presença de uma ampla faixa de concentração do íon cálcio. Ela representa 15% do total das caseínas e atua como agente estabilizador da micela. Esta proteína é constituída de 169 aminoácidos, com pelo menos um grupo fosfato e uma porção glicídica variável. Nas micelas de caseína, a maioria da  $\kappa$ -caseína está próximo à superfície e as cadeias que sobressaem de sua porção C-terminal conferem à micela uma superfície “pilosa”, que confere estabilidade à micela e, uma vez removida, a estabilidade coloidal é destruída e o leite coagula ou precipita (ANDRADE, 2010). Durante a fabricação de queijos, a renina, um agente de coagulação, age sobre a  $\kappa$ -caseína, especificamente entre a ligação dos aminoácidos 105 e 106 (Phe-Met) liberando um macropeptídeo hidrofílico contendo 64 aminoácidos (106 a 169) ligado ao ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico. Esse fragmento é conhecido também como glicomacropeptídeo e é encontrado no soro de queijo. O termo CMP é usado, pois a  $\kappa$ -caseína contém teores

variados de carboidratos, e há possibilidade de conter fragmentos com ausência de glicídios. Nesse caso o peptídeo terminal é chamado de caseinomacropeptídeo (CMP). O outro fragmento da  $\kappa$ -caseína é denominado de para  $\kappa$ -caseína (1-105) e consiste na parte hidrofóbica que permanece na massa do queijo.

A quantificação do teor de CMP tem sido usada para detecção de fraude de soro de queijo adicionado ao leite, já que não é esperado encontrar este peptídeo acima de determinadas concentrações no leite de boa qualidade.

## 2.6. Métodos oficiais de detecção de fraude por adição de soro de queijo ao leite

A determinação quantitativa do caseinomacropeptídeo (CMP), resultante da ação proteolítica de enzimas, é um método oficial utilizado para avaliação da qualidade do leite, incluindo a detecção da adição fraudulenta de soro de queijo. A legislação vigente é a Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006), que estabeleceu dois métodos para a determinação de CMP no leite. Um dos métodos é baseado na determinação do CMP por CLAE e o outro o método é o da ninidrina ácida, que é baseado na determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ligado ao caseinomacropeptídeo que é liberado da  $\kappa$ -caseína, na região visível do espectro, a 470 nm (LASMAR *et al.*, 2011; FUKUDA, 1994).

### 2.6.1 Método da dosagem do ácido siálico

Esse método baseia-se na presença do ácido siálico, também denominado de NANA (ácido N- acetil neuroamínico), que é um dos carboidratos ligados ao CMP. Para a execução dessa técnica é necessária a precipitação das proteínas com ácido tricloroacético. O macropeptídeo ficará no filtrado e para o isolamento do ácido siálico, é necessário precipitá-lo com a adição de ácido fosfotúngstico (AFT). Após duas lavagens com etanol e secagem, o NANA é liberado como cromóforo púrpura devido a

reação com o resorcinol (LASMAR *et al.*, 2011; FUKUDA, 1994).

A substituição do agente complexante resorcinol pelo agente de Erlich, possibilita a detecção da adulteração de leite fresco pasteurizado com, no mínimo, 2% de soro de leite. Porém, é um método que demanda tempo excessivo (MAGALHÃES, 2008).

Em 1994, Fukuda adaptou para leite uma técnica descrita por Yao *et al.* (1989) para a determinação da concentração de ácido siálico em sialoglicoproteínas presentes no líquido ascítico formado a partir de tumores abdominais. O método utiliza como cromóforo a ninidrina ácida (Reagente 2 de Gaitonde) (FUKUDA, 2004). No mesmo ano, Fukuda *et al.* (2004) propuseram a padronização do método da ninidrina ácida para a determinação quantitativa do ácido siálico (NANA) livre ou ligado ao glicomacropéptido, utilizando a espectrofotometria a 470 nm. O método obteve bons resultados com pequenas variações (ao redor de 2%), e mostrou-se de fácil execução, podendo ser usado na rotina por não requerer equipamentos sofisticados e mão de obra qualificada (FUKUDA, 2004).

Furlanetti e Prata (2003) utilizaram o método da ninidrina ácida para análise de leite bovino durante a lactação, e concluíram que o GMP livre varia em função do período de lactação e em consequência de mastites clínicas e subclínicas.

O método colorimétrico adaptado é uma técnica que consiste na adaptação do método qualitativo da dosagem do ácido siálico, adotado pelo MAPA (BRASIL, 1991). Essa adaptação não utiliza o reativo de Erlich mas sim a espectrofotometria na região visível do espectro a 520nm, no qual a leitura é feita com base na absorbância da opacidade pelo resíduo de ácido siálico. Este método foi criado com o intuito de ser mais rápido, realizado sem mão de obra especializada e como técnica de triagem (SOUZA, 2007).

Souza (2007) comparou as técnicas de CLAE, ninidrina ácida e o método colorimétrico adaptado por OLIVEIRA *et al.* (1998) para detecção de soro de queijo em leite. Os autores concluíram que os

métodos da ninidrina ácida e colorimétrico adaptado possuem sensibilidade inferior a CLAE, mas em contrapartida podem ser usados como teste de triagem por serem de fácil execução e rápidos.

### 2.6.2 Cromatografia

A cromatografia consiste em um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. Fundamenta-se na migração diferencial dos componentes da mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação (com padrões previamente existentes) para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura (DEGANI *et al.*, 1998).

Em se tratando da fase móvel, tem-se as cromatografias gasosa, líquida e a supercrítica (CSC). A cromatografia líquida se divide em: cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A CLAE possui a capacidade de realizar análises quantitativas de amostras em que estão presentes uma grande quantidade de compostos, em poucos minutos e com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

Por exemplo, o uso da cromatografia líquida de alta eficiência com filtração em gel (CLAE-FG), para determinar a quantidade de CMP no leite é considerado um método sensível e rápido (CARVALHO *et al.*, 2007a). Outro tipo de CLAE (em coluna de fase reversa, CLAE-FR) foi utilizada para estudar o comportamento da proteólise no leite, causada por bactérias psicrotóxicas. Porém esse método foi considerado mais complexo, demorado e de alto custo (OLIEMAN; BEDEM; VAN DEN (1989), citado por CARVALHO *et al.*, 2007a).

Oliveira *et al.* (2009) verificaram que o tempo de armazenamento do leite pode interferir no resultado do índice de CMP, podendo aumentar e levar a alterações no resultado obtido pela CLAE. Da mesma forma Vidal-Martins *et al.* (2005) observaram que a proteólise decorrente de bactérias psicrófilas do leite cru aumenta no decorrer do tempo de armazenamento do leite UAT.

O CMP, devido a sua constituição, possui caráter hidrofílico, estabilidade térmica elevada e peso molecular de 8.000 Daltons e pode ser separado de outros peptídeos e proteínas pela CLAE (LASMAR *et al.*, 2011).

O MAPA oficializou a CLAE-FG como o método físico-químico oficial para a detecção do CMP em leite e produtos lácteos. A curva de calibração do equipamento de cromatografia deve ser feita com padrões de CMP para que o método se torne ainda mais seguro. O resultado é expresso em concentração de CMP, em mg/L (IN nº68 do MAPA) (Brasil, 2006).

Segundo Magalhães (2008), outros métodos para detecção de soro ao leite têm sido estudados, mas estes métodos ainda apresentam baixa sensibilidade e longo tempo de análises.

De acordo com a IN nº69 do MAPA (Brasil, 2006), somente quando o índice de CMP for de até 30 mg/L o leite poderá ser destinado ao consumo direto. Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 e 75mg/L este poderá ser destinado à produção de alguns derivados lácteos. Em valores acima de 75 mg/L resultará em destinação à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).

### **2.7. Outros métodos para detecção de soro de queijo ao leite**

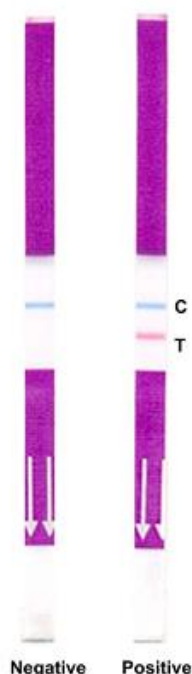
Bremer *et al.* (2008) testaram um ensaio imunoenzimático inibitório (ELISA) para a detecção de soro de queijo bovino (BRW) em leite em pó. Este teste foi criado com

objetivo de ser um método de triagem alternativo, de fácil utilização, barato e específico. O ELISA utiliza um anticorpo monoclonal específico desenvolvido contra o CMP com limite de detecção de 1% (w/w). Para avaliar a adequação do ELISA, 60 amostras comerciais de leite em pó foram analisadas pela técnica do ELISA, CLAE-FG e CLAE-FR. O método ELISA foi considerado de fácil execução e tempo de ensaio curto, quando comparado com a CLAE-FG, método oficial pela UE (União Européia). A sensibilidade alcançada pelo teste foi adequada para utilização como triagem de acordo com a legislação da UE. Não foram verificados resultados falsos negativos pelo ELISA e o número de resultados falsos positivos foi inferior ou comparáveis aos resultados da CLAE-FG.

Um teste qualitativo imunocromatográfico (Stick cGMP) para detecção de CMP no leite também foi desenvolvido, sendo considerado rápido e sensível. O teste é baseado na reação do CMP presente nas amostras de leite com as partículas coloidais que estão recobertas com o anticorpo monoclonal específico frente ao glicomacropéptido. Este complexo de partículas coloidais/anticorpo/CMP migram por um processo cromatográfico para a zona de reação, onde há outros anticorpos anti-CMP que reagem com esse complexo, originando uma linha vermelha no caso de amostras positivas. Ao mesmo tempo, uma reação semelhante ocorre com partículas coloidais azuis que causa a formação de uma linha de controle de cor azul, indicando correto desempenho do teste (HERNÁNDEZ.; MUNÓ.; DAURY.; *et al.* 2009) (Fig. 2).

Oancea (2009) analisou amostras de leite e bebidas lácteas obtidas a partir de fontes comerciais, pelo teste imunocromatográfico com anticorpos monoclonais altamente específicos. O CMP foi detectado em 70% das amostras selecionadas. Concluiu-se que o procedimento descrito é uma ferramenta útil para a detecção de rotina de adição fraudulenta de soro a leite e produtos lácteos.

Figura 2: Resultados positivos e negativos para GMP, utilizando-se o kit Stick c-GMP (C – azul linha de controle, e T - linha de teste vermelho; As setas referem-se à extremidade da fita que é mergulhada na solução de amostra).



Fonte: HERNÁNDEZ *et al.* (2009)

Hernández *et al.* (2009) avaliaram o desempenho do teste (Stick cGMP) em leite em pó desnatado, pasteurizado e UHT adicionados de 0, 1, 2, 4 ou 16 % ( v/v ) de soro de queijo. As amostras com adição de soro de queijo de 2 a 16% foram claramente detectadas como positivas enquanto as amostras de leite adicionadas de 1% de soro de queijo foram classificadas como fracamente ou muito fracamente positivas. Os autores observaram ainda que a resposta em leite pasteurizado foi mais fraca do que no leite em pó, cru e UHT. Além disso, sessenta amostras de leite cru provenientes de fazendas leiteiras também foram analisadas pelo Stick cGMP e os resultados comparados a CLAE-FG e aos métodos à base de ácido siálico. Em geral, os resultados obtidos pelos três métodos foram semelhantes. Esta pesquisa mostrou que o novo teste identificou corretamente todas as amostras de leite com um teor de soro de queijo maior que 4%. Não foram encontrados resultados falso positivos, sendo que os resultados obtidos foram semelhantes

ao método CLAE-FG e foram mais confiáveis do que os do método colorimétrico. Dessa forma, os autores propõem o uso deste método como uma ferramenta de triagem. As vantagens seriam a rapidez e eficiência, assim como pouca necessidade de treinamento ou equipamento sofisticado. Seria, então, uma ferramenta para aplicação na plataforma de recepção do leite nos laticínios, permitindo que ação seja tomada antes que o leite seja processado.

Kasemsumran *et al.* (2007) investigaram a viabilidade da utilização de uma técnica baseada na espectroscopia de infravermelho (NIR), para detecção e quantificação de água e de soro de leite como adulterantes em leite. Os resultados obtidos por eles demonstram que espectroscopia NIR é viável para detectar adulterantes tais como água e soro de leite, e para determinar o seu conteúdo no leite.

Recio *et al.* (2000) estudaram a aplicação da eletroforese capilar para detecção de sólidos de soro de queijo em amostras de leite UAT genuínas e adulteradas, bem como amostras comerciais. Além disso, dois lotes de leite, com e sem soro de leite, foram adicionados ao leite UAT, sob condições controladas de armazenamento e temperaturas diferentes, para avaliar a influência da atividade proteolítica durante o armazenamento. O estudo indicou que a eletroforese capilar foi eficiente na detecção de sólidos de soro de queijo adicionado ao leite e que interferências devido apenas à proteólise intensa, ocorrem após longo período de armazenamento ou a temperaturas elevadas.

Ayala *et al.* (2009) determinaram a presença de soro de queijo em amostras de leites UHT comercializadas na Cidade do México, pela técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), CLAE e da UV-4<sup>ª</sup>-DS (espectro de absorção derivada da quarta). De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a porcentagem de amostras positivas com soro de queijo analisadas por eletroforese, CLAE e UV-4<sup>ª</sup>DS foi de 70, 50 e 90%, respectivamente. As técnicas utilizadas relacionadas com a detecção e estimativa do CMP por eletroforese ou por CLAE e os



resultados obtidos indicaram que a quantificação da relação proteínas de soro/proteína total (PS/PT) por UV-4<sup>DS</sup> foi um indicador mais sensível a adições de soro de queijo.

## 2.8. Proteólise como fator interferente na pesquisa de soro em leite

Um fator que deve ser considerado na análise de CMP no leite é a proteólise que pode ocorrer naturalmente ou devida à contaminação microbiana no leite. Por exemplo, a principal proteína do leite, caseína, é extremamente sensível à proteólise, devido a sua estrutura e organização espacial (FUKUDA, 2004).

Segundo Cromie (1992) citado por Fukuda (2004) pode ocorrer proteólise da caseína quando o leite é estocado a baixas temperaturas, pois a  $\beta$ -caseína se dissocia da micela e isso faz com que a caseína se torne até 30% mais solúvel. A proteólise do leite ocorre devido à ação de enzimas nativas, como a plasmina, por enzimas adicionadas ao leite, como a renina utilizada na fabricação de queijos ou ainda por enzimas produzidas por micro-organismos presentes no leite (LASMAR *et al.*, 2011).

Proteases termoestáveis derivadas de bactérias psicrotróficas, embora menos específicas que a quimosina, também hidrolisam a  $\kappa$ -caseína próximo à posição 105-106, levando a formação de pseudo-CMP (Recio *et al.*, 2000). O caseinomacropéptido (CMP) é um peptídeo presente no soro de queijo, que é formado a partir da quebra da  $\kappa$ -caseína pela ação da quimosina, durante a produção de queijo. Porém, pode ocorrer também a formação do pseudo-CMP pela ação de proteases bacterianas sobre a  $\kappa$ -caseína (MOTTA.; HOFF., 2009). Apesar destas enzimas microbianas não clivarem a  $\kappa$ -caseína na posição específica 105-106, hidrólise próximo a metionina (posição 106) e alanina (posição 107) resulta em polipéptidos (pseudo-CMP) com mesmo tamanho, ou próximo, e que não se distingue do CMP usando apenas HPLC (VILLANOEVA *et al.*, 2014).

A maioria das bactérias psicrotróficas não sobrevive à pasteurização, porém suas enzimas permanecem ativas, pois são termoresistentes. Esse problema pode ser prevenido pela sanitização de equipamentos de ordenha e do tanque de refrigeração, resfriamento rápido do leite após a ordenha e manutenção do mesmo em temperatura baixa até o momento do processamento térmico. Também não se deve efetuar a estocagem do leite refrigerado por período de tempo muito longo (SANTOS *et al.*, 2010)

A qualidade dos produtos lácteos está diretamente relacionada à qualidade microbiológica da matéria-prima, ou seja, do leite cru. Temperatura, condições e períodos prolongados de armazenamento podem influenciar o crescimento de micro-organismos, principalmente os psicrotróficos. Estes produzem enzimas, particularmente lipases e proteases que são termoresistentes e continuam deteriorando o produto (MARTINS *et al.*, 2005).

De acordo com Cardoso (2006) se o leite for obtido em condições higiênicas adequadas, a microbiota psicrotrófica representa menos de 10% da microbiota total do leite fresco, enquanto em condições inadequadas de higiene essa microbiota pode representar mais de 75%. Espécies do gênero *Pseudomonas* representam as bactérias psicrotróficas deterioradoras predominantes do leite cru refrigerado, particularmente *Pseudomonas fluorescens* (SANTOS *et al.*, 2010).

Friedrich *et al.* (2010) avaliaram a estabilidade de amostras de leite UHT e de leite *in natura* em relação à temperatura e ao tempo de armazenamento, quanto ao índice de CMP. Verificaram que a proteólise foi progressiva tanto para as amostras de leite UHT como para leite *in natura* refrigerado, durante todo esse período de armazenamento, sendo o principal indicador do aumento dos níveis de CMP, indicando que nem sempre uma concentração de CMP acima de 30 mg L<sup>-1</sup>, valor estabelecido pelo MAPA, representa adulteração por adição de soro. Outro fator considerado relevante nesse estudo foi que, em amostras de leite congelado, a concentração de CMP não

apresentou grandes variações, mantendo-se estável em todo o tempo de armazenamento, indicando que o congelamento auxilia na conservação da integridade da amostra.

Lasmar *et al.* (2011) estudaram a viabilidade do uso de amostras de leite cru conservadas com o bronopol na pesquisa de soro de queijo pela CLAE e concluíram que é possível utilizar amostras de leite cru conservadas com o bronopol por até 8 dias, para a pesquisa de soro de queijo pela CLAE, e que essas amostras podem ser armazenadas por até 8 dias em temperaturas de 7 e 30°C sem que ocorram alterações na pesquisa do CMP. Esse estudo sugeriu a substituição do congelamento das amostras pela adição de bronopol proporcionando mais facilidade às indústrias de laticínios que desejam monitorar fraudes ocorridas pela adição de soro de queijo nas propriedades rurais.

Problemas associados à produção e qualidade da matéria prima, processamento tecnológico e outros, ao longo de toda cadeia produtiva do leite, podem prejudicar a exatidão dos métodos analíticos, baseados principalmente na identificação do CMP, consistindo ainda em um desafio a ser vencido (FURTADO, 2010).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Procedimento cromatográfico**

##### **3.1.1 Coleta das amostras**

Foram coletadas 56 amostras de forma aleatória, de leite pasteurizado no mercado varejista de Minas Gerais (Figura 3), de 32 marcas e lotes comerciais diferentes, sendo: 29 da região Metropolitana, 4 do Centro-Oeste, 4 do Noroeste, 5 da Zona da Mata, 7 do Triângulo Mineiro, 3 do Alto Paranaíba e 4 do Sul de Minas, de diferentes origens de inspeção (SIF, IMA, municipal ou não consta) e processador (Cooperativa ou indústria privada). A diferença em relação ao n amostral de cada mesorregião se justifica pela dificuldade de encontrar marcas comerciais de leite pasteurizado no mercado varejista, uma vez que o consumo

de leite UHT está crescendo consideravelmente. Segundo pesquisa da Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV) (2009), o leite UHT está presente em 87% dos domicílios brasileiros, representando 76% do leite fluido de consumo e mais de 47% do total de leite consumido no Brasil. As amostras de leite foram coletadas respeitando período de validade das mesmas e essas foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e enviadas ao Laboratório de Cromatografia da UFMG, onde foram congeladas até serem submetidas às análises em até duas semanas.

##### **3.1.2 Análise de CMP**

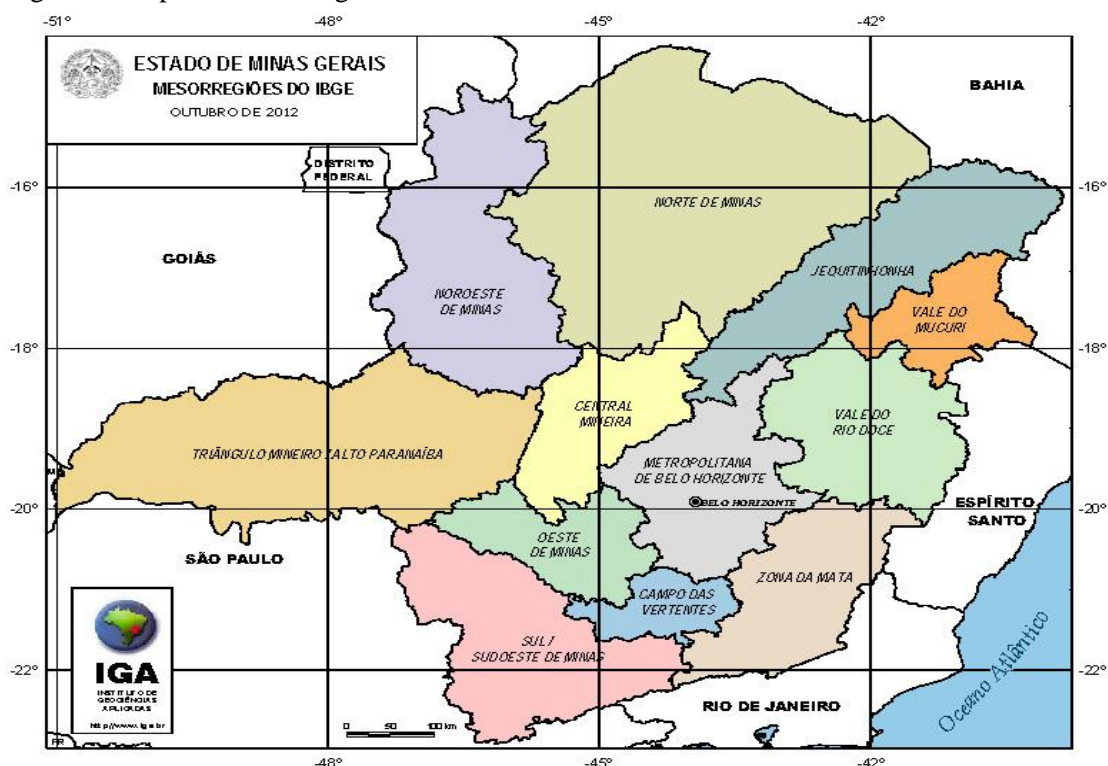
Para análise do índice de CMP, adotou-se a metodologia oficial, IN n°68 do MAPA, descrita abaixo (BRASIL, 2006). A cromatografia foi feita por meio do cromatógrafo líquido (Shimadzu CLASS VP 6.1) com coluna Zorbax GF 250 (Fig., 4) cujo princípio de separação se baseia na exclusão molecular, com fluxo de fase móvel de 1,5mL por minuto com tampão fosfato pH 6,0 e detecção ultravioleta no comprimento de onda de 205nm.

##### **3.1.3. Preparo da curva de calibração**

Foram preparadas, soluções padrão de CMP que contemplassem, no mínimo, um ponto abaixo de 30mg/L e um ponto acima de 75mg/L em leite fluido integral, isento de fraude a saber: 15mg/L, 30mg/L, 45mg/L, 60mg/L, 75mg/L e 90mg/L, além de um branco de leite fluido integral (0mg/L).

Em seguida as amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético, deixadas em repouso por 60 minutos e filtradas em papel de filtro qualitativo. Aproximadamente 20µL de material filtrado foram injetados no cromatógrafo, com fluxo da fase móvel de 1,5mL por minuto. Foi construído um gráfico de índice de CMP *versus* a altura do cromatograma obtido e calculada a reta de regressão linear aceitando-se valores com  $R \geq 0,95$  (Fig., 5).

Figura 3: Mapa das mesorregiões de Minas Gerais.



Fonte: Estado de Minas Gerais. Mesorregiões do IBGE. Disponível em: <http://www.mg.gov.br/governomg/ecp/contents.do?evento=conteudo&idConteudo=69547&chPlc=69547&termos=s&app=governomg&tax=0&taxn=5922>. Acesso em: 10 fev. 2014.

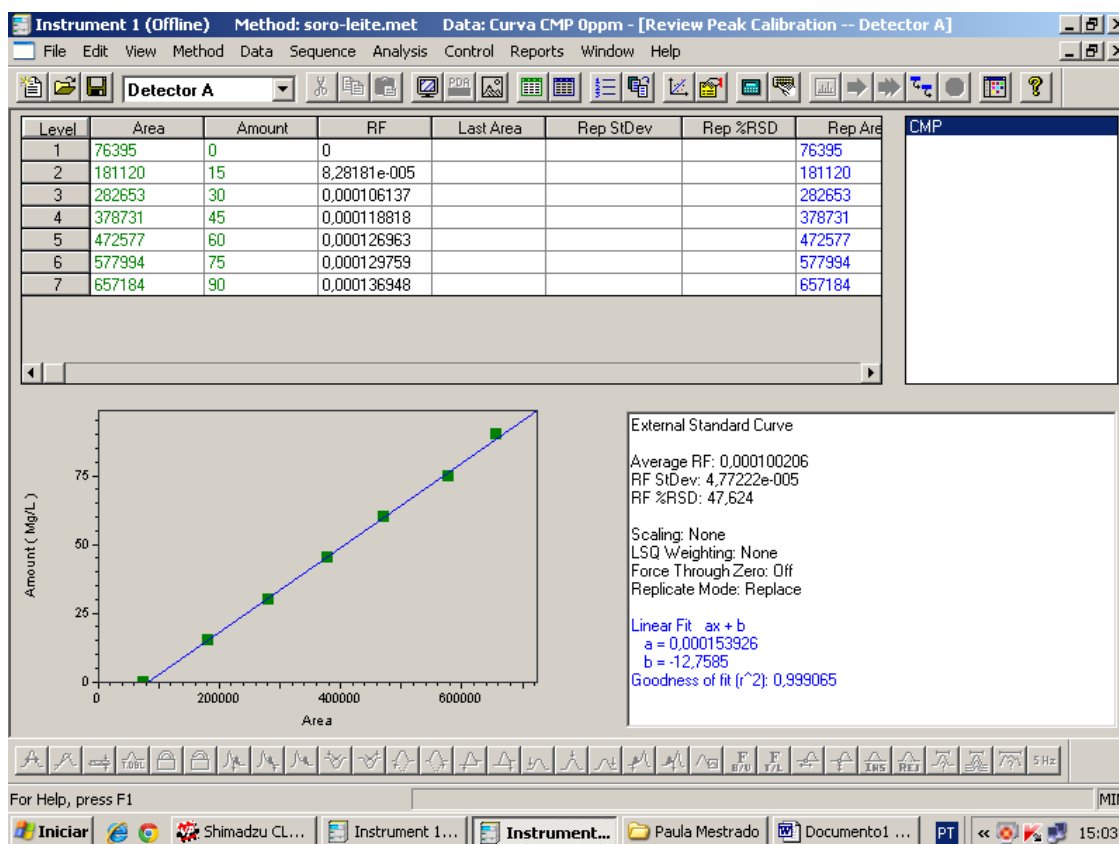
Figura 4: Cromatógrafo utilizado para determinação do índice de CMP (mg/L) em amostras de leite pasteurizado das mesorregiões de Minas Gerais.



Fonte: Arquivo pessoal



Figura 5: Curva padrão de diferentes concentrações de CMP (0mg/L, 15mg/L, 30mg/L, 45mg/L, 60mg/L, 75mg/L e 90mg/L) já calculada equação da reta de regressão com valor de  $r > 0,95$ .



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.1.4 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas adicionando-se, lentamente e sob agitação constante, 10mL de ácido tricloroacético (24%) a 20mL de leite fluido, seguido pelo procedimento descrito anteriormente para o preparo das amostras da curva de calibração.

### 3.1.5 Análise quantitativa

A quantificação do índice de CMP foi comparada ao cromatograma das amostras frente ao da curva de calibração.

O cálculo da concentração de soro de queijo nas amostras foi feito 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:  $y = ax + b$  (LASMAR *et al.*, *et* 2011).

Em que:  $x$  = concentração em % de soro  
 $y$  = altura do pico

$a$  = inclinação da reta

$b$  = intersecção com o eixo  $y$ ,

ou seja,

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

### 3.1.6. Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva, associando-se a ocorrência e os diferentes níveis de CMP das amostras de leite pasteurizado nas regiões citadas em 3.1 de acordo com os critérios estabelecidos pelo MAPA (Brasil, 2006), a origem da inspeção (SIF, IMA, municipal ou não consta) e processador (Cooperativa ou indústria privada).

### **3.2. Análises físico-químicas**

Das 56 amostras analisadas na CLAE ,29 foram submetidas às análises no Laboratório de Físico-Química da Escola de Veterinária da UFMG, com duas repetições para cada amostra analisada, de acordo com a Metodologia descrita pela IN n°68 do MAPA (BRASIL, 2006):

- 1- Acidez Titulável, pelo método Dornic;
- 2- Teor de Gordura, pelo método butirométrico de Gerber;
- 3- Densidade a 15°C, pelo método do termolactodensímetro;
- 4- Teor de proteína, determinação do Nitrogênio Total, método de Kjeldahl;
- 5- Teor de Umidade por aquecimento a 102°C por 5 horas e repetição do procedimento a cada 1 hora até obtenção de peso constante;
- 6- pH (pHmetro digital);
- 7- Determinação do Índice Crioscópico.

#### **3.2.1. Análise estatística**

Foi realizada a análise estatística descritiva, com determinação de médias e desvio-padrão das amostras totais e por mesorregiões de MG.

A correlação das variáveis foi calculada para verificar se a variação de uma delas acompanha proporcional ou inversamente a concentração de CMP. As variáveis não paramétricas foram avaliadas por meio da correlação de Spearman (SAMPAIO, 2002).

### **3.3. Avaliação dos métodos BRW Elisa e Stick cGMP para determinação e detecção do CMP no leite**

#### **3.3.1. Preparo das amostras**

Foram analisadas 18 amostras de leite pasteurizado de diferentes marcas comerciais, coletadas no mercado varejista de Belo Horizonte-MG e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Análises Cromatográficas (Escola de Veterinária da

UFMG), para posterior análise usando os métodos CLAE-FG e os testes imunoquímicos Stick cGMP e BRW Elisa. As amostras de leite foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e enviadas ao Laboratório de Cromatografia da UFMG, onde foram congeladas até serem submetidas às análises em até duas semanas.

#### **3.3.2. Análises cromatográficas**

As análises cromatográficas foram feitas conforme descrito no item 3.1.2

#### **3.3.3. Análise por meio do método BRW Elisa**

As amostras foram analisadas seguindo-se os procedimentos da Figura 6, conforme o manual anexo ao kit BRW Elisa.

#### **3.3.4. Análise por meio do método Stick cGMP**

As amostras foram analisadas conforme Figura 7, seguindo-se o manual anexo ao kit Stick cGMP. Os resultados foram expressos qualitativamente como, negativo, suspeito ou positivo e quantitativamente, por faixa de CMP, seguindo orientação do manual.

#### **3.3.5. Análise estatística**

Os resultados qualitativos e os resultados semi-quantitativos (faixas de concentração CMP) obtidos pelo Stick cGMP foram comparados por associação por meio do teste de Qui-quadrado.

Os resultados quantitativos do método BRW Elisa foram comparados por meio de Modelo de Regressão Linear, utilizando-se modelos com valores absolutos de CMP e significância de 5%.

Figura 6: Esquema analítico para análise de determinação quantitativa de CMP em amostras de leite pasteurizado pelo BRW

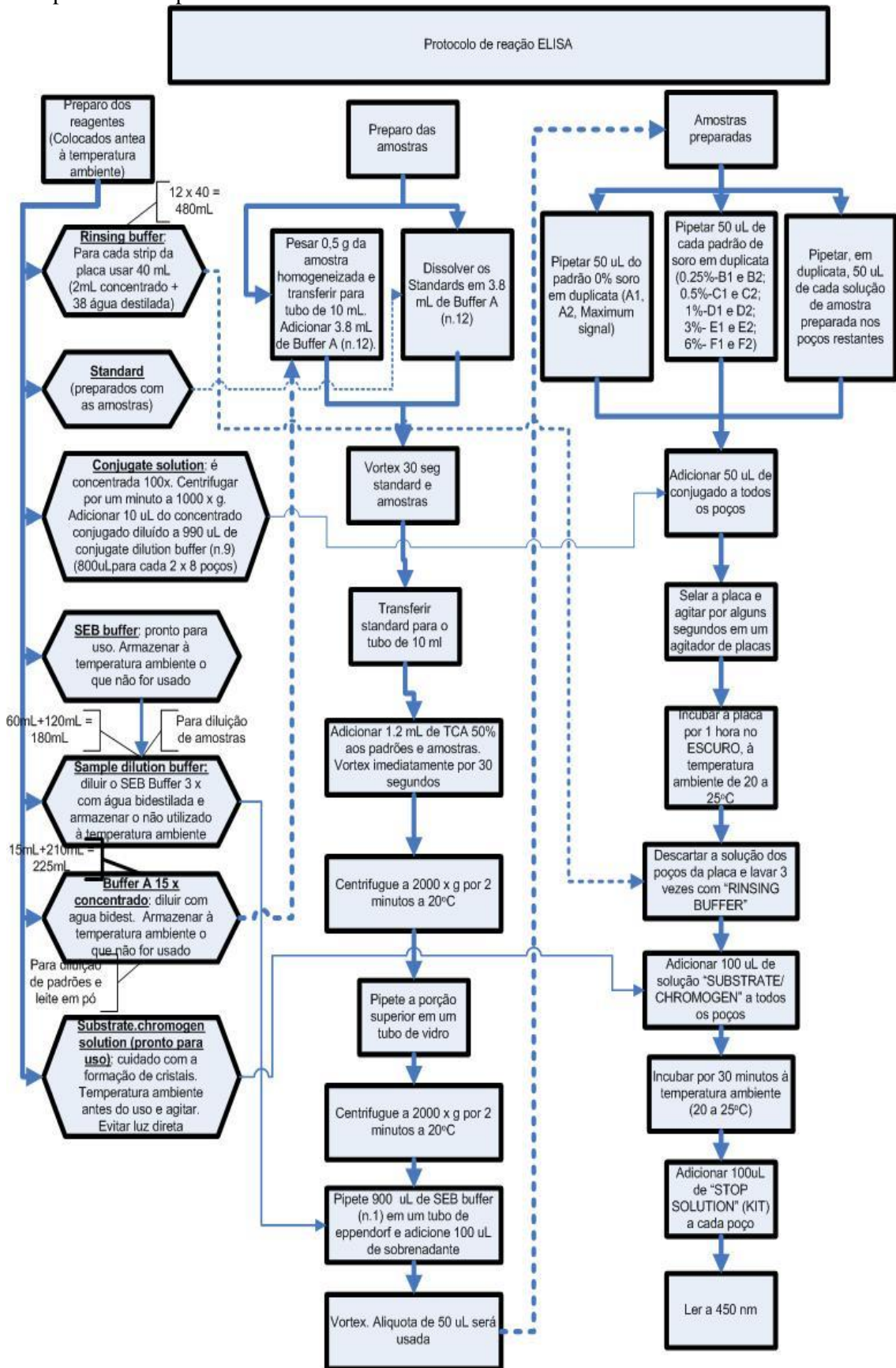




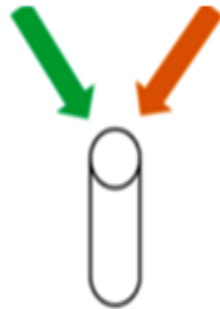


Figura 7: Esquema analítico para análise de soro de queijo ao leite por determinação qualitativa e semi-quantitativa de GMP em amostras de leite pasteurizado pelo Stick cGMP.

### Análise Stick cGMP

1. 6mL de leite

2. 4mL de TCA



3. Tampar

4. Agitar

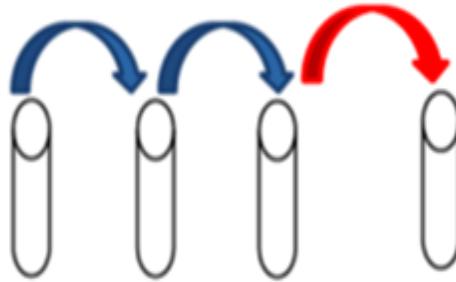
5. Repouso 10 minutos

6. Centrifugar 1500rpm/10 minutos

7. Filtrar

8. Diluir 3 vezes (diluyente do Kit)

9. Adicionar fita teste, retirar após 5 minutos, cortar ponta absorvente e ler o resultado, comparando com o cartão de referência



Tubo 1

Tubo 2

Tubo 3

Tubo 4

900 µL

+

100 µL

do filtrado

900 µL

+

100 µL

do tubo 1

900 µL

+

100 µL

do tubo 2

500 µL do tubo 3

+

FITA TESTE

### RESULTADO

Positivo: > 4% soro de queijo

Suspeito: 1-2% soro de queijo

Negativo: < 1% soro de queijo

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Diagnóstico da fraude por adição de soro de queijo ao leite nas mesorregiões de Minas Gerais

As regiões de origem das 56 amostras de leite pasteurizado analisadas estão distribuídas na Figura 8.

Dentre as amostras analisadas 68% estavam de acordo com a legislação (IN n° 69 do MAPA, 2006) em relação ao teor de CMP (mg/L) e 32% estavam em desacordo, sendo que 2% destas estavam com índices de CMP entre 30 e 75 mg/L e 30 % com índices superiores a 75mg/L (Fig., 9).

Figura 8. Percentual de amostras de leite pasteurizado coletadas por mesorregiões de Minas Gerais (n=56) para pesquisa de soro por meio do método CMP.

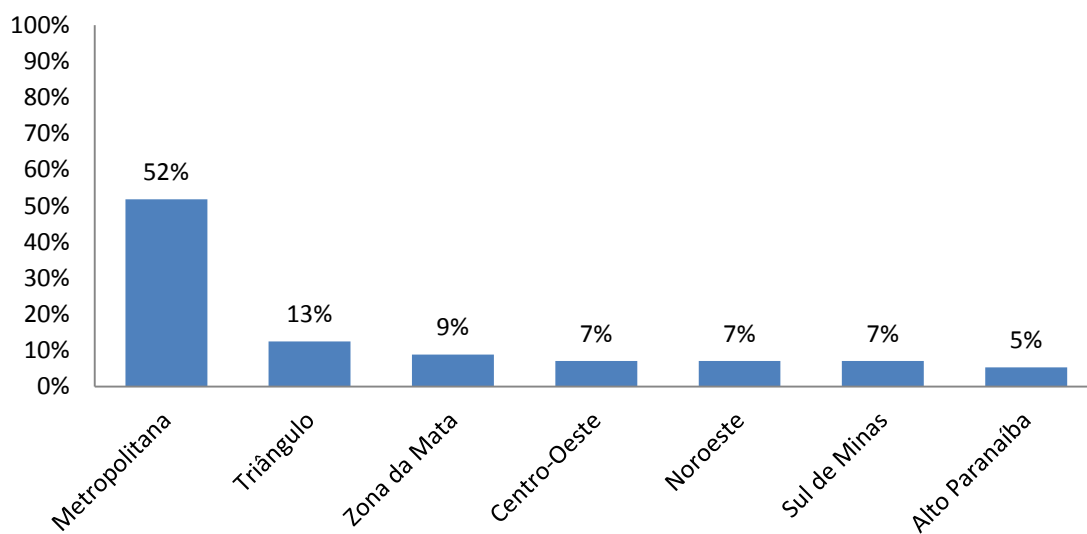
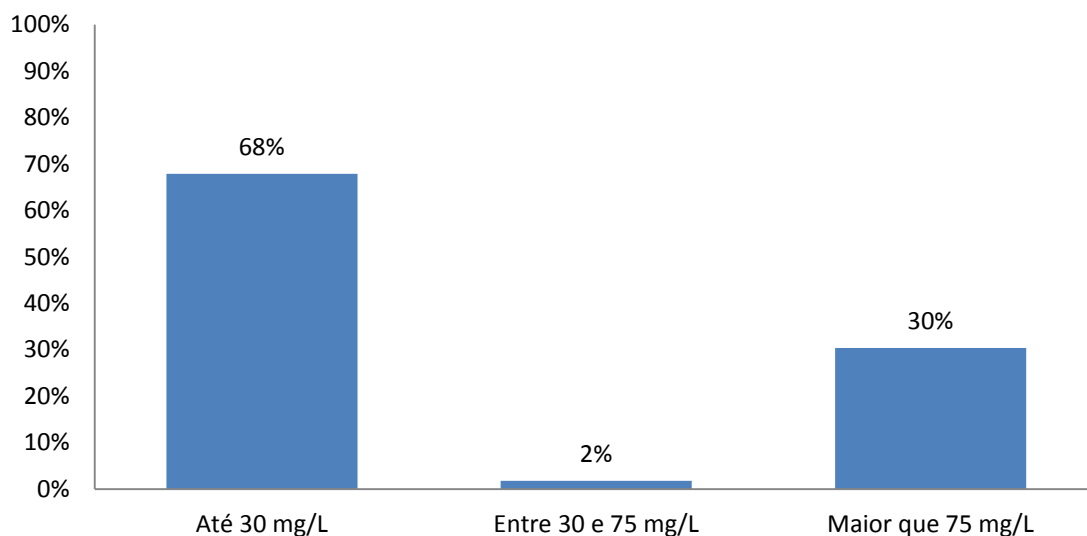


Figura 9. Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas em relação ao índice de CMP estipulado pela Legislação (IN n°69/2006) (n=56).



De acordo com a IN nº69, leites que apresentam índices de CMP até 30mg/L podem ser destinados ao consumo direto, enquanto leites com índices entre que 30 até 75 mg/L devem ser destinados à produção de derivados lácteos. Leite com valores de CMP acima de 75 mg/L devem ser destinados à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).

Segundo Friedrich *et al.* (2010) o leite fresco apresenta naturalmente um baixo índice de CMP, o qual tende a aumentar com o tempo de armazenamento, devido a ação proteolítica do próprio leite. O congelamento pode retardar essa ação proteolítica e se a determinação do índice de CMP for realizada em um período de até 30 dias após a coleta, não ocorre interferência significativa neste índice.

Leite *et al* (2012) analisaram 125 amostras de leite em pó em 2009 e 2010 provenientes de diversos laticínios do país por CLAE. As amostras apresentaram níveis CMP variando de 0 a 1.150 mg/L. Do total analisado, 73,3 % das amostras analisadas estavam aptas para consumo humano com níveis de CMP até 30 mg/L, enquanto 21,8 % das amostras apresentaram níveis de CMP variando entre 30 e 75 mg/L e 4,8 % das amostras estavam

com CMP acima de 75mg/L. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho, onde 30% das amostras também encontram-se impróprias ao consumo humano.

Brandão (2003) também detectou leite adulterado por soro de queijo. Ao analisar 38 amostras de leite em pó de diversas marcas de atuação nacional. Em 21 delas foram encontradas adição ilegal de soro, e em uma delas, o teor de adição de soro de leite chegou a 60% (Pesquisa, 2003). Os resultados encontrados no presente experimento indicam que esta prática criminosa ainda é incidente e a ocorrência em leite pasteurizado também é preocupante.

As mesorregiões estudadas possuem diferenças em relação à qualidade do leite pasteurizado analisado. Na análise das regiões como, Zona da Mata, Centro-oeste, Noroeste e Sul de Minas, 100% das amostras apresentaram índices de CMP abaixo de 30 mg/L, ou seja, sem indicativo de fraude por adição de soro ao leite. Na região Metropolitana 69 % das amostras estavam com índice de CMP até 30 mg/L, 3,4 % apresentaram níveis de CMP que indicavam destino para a produção de derivados lácteos e 27,6% não estavam aptas ao consumo humano. Para melhor visualização dos dados as mesorregiões,

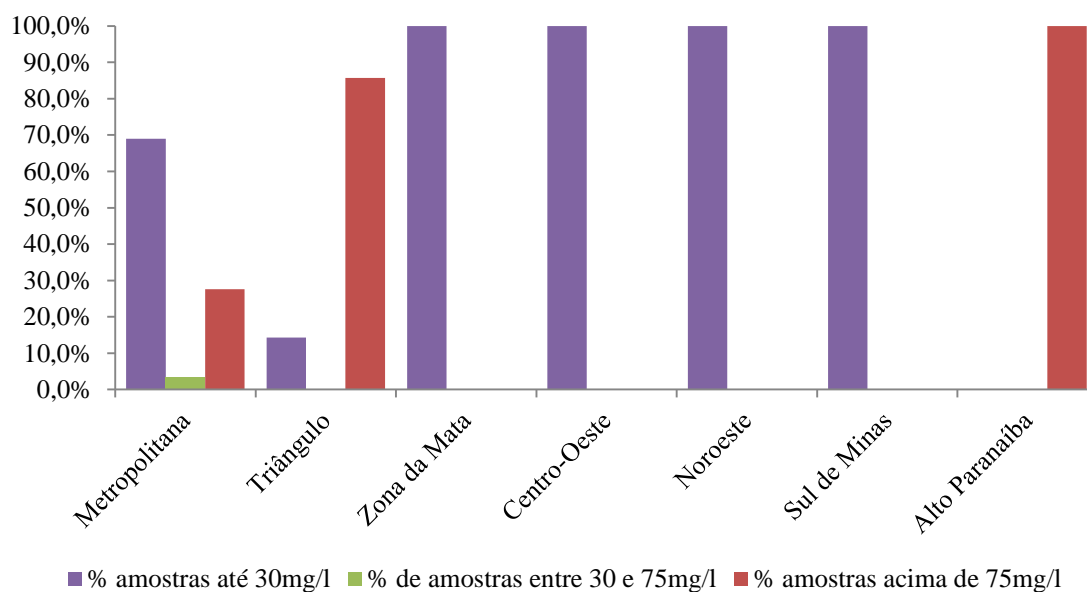
Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro foram agrupadas em uma só região. As amostras analisadas nessa região, apresentaram altos níveis de adulterações, com média de CMP chegando a 545,71 mg/L (Tab., 2). Apenas 10% dessas amostras não apresentavam índices de CMP indicativos de fraude sendo que 90% das amostras desta região apresentaram índices de CMP acima de 75mg/L (Figura 10).

Estes dados evidenciam a necessidade de intensificação nas ações de fiscalização dos produtos lácteos. Considera-se também a necessidade iminente da atualização e implementação de métodos analíticos alternativos, uma vez que a CLAE envolve um alto custo operacional, equipamento sofisticado e mão de obra qualificada.

Tabela 2. Tabela das médias de CMP por mg/L das amostras de leite pasteurizado acima de 75mg/L das mesorregiões de Minas Gerais.

Região	Número de amostras acima de 75 mg/L	Média de CMP
Metropolitana (n= 29)	8	257,85
Alto Paranaíba/ Triângulo (n= 10)	9	545,71
Total Geral (n= 39)	17	410,25

Figura 10. Percentual total de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE- FG em relação ao índice de CMP estipulado pela Legislação (IN nº69,2006) por mesorregiões de Minas Gerais (n= 56).



Os resultados dos índices de CMP das amostras de leite pasteurizado provenientes do Alto Paranaíba/ Triângulo Mineiro são muito preocupantes, visto essas regiões são as maiores produtoras de leite do Sudeste do país, além de apresentarem o maior índice de crescimento em produção de leite do

estado (FONSECA E ZOCCAL, 2009). Em 2012 as regiões do Triângulo e Sul de Minas juntas, foram responsáveis por 41,8% da produção de leite em Minas Gerais (PILA, 2013). No entanto, vale ressaltar que todas as amostras do estudo foram adquiridas em estabelecimentos comerciais, o que indica a

necessidade de avaliação constante da qualidade do leite comercializado e consumido pela população, no intuito de coibir a fraude econômica ou qualquer tipo de adulteração que possa lesar o consumidor.

A Tabela 3 apresenta os valores médios de CMP das mesorregiões em estudo. Observa-se que os níveis médios de CMP das amostras de leite pasteurizado coletadas do Alto Paranaíba/ Triângulo Mineiro e Metropolitana estão muito acima do limite (30 mg/L). Níveis de CMP acima de 75mg/L sugerem uma adição fraudulenta de soro de queijo ou extrema deterioração do produto causada por micro-organismos psicrotóxicos (FRIEDRICH *et al.*, 2007). Todas as análises foram conduzidas com o leite conservado sob congelamento (máximo 2 semanas) até serem submetidos às análises e com suas características sensoriais preservadas, diminuindo a probabilidade de

resultados falso-positivos. Além das amostras obtidas terem sido produzidas no máximo três dias antes da coleta e não apresentarem nenhuma alteração visível de qualidade, como alteração de sabor e odor, perda da consistência e gelatinização do leite, muitas destas amostras apresentaram valores extremamente elevados de CMP, sugerindo a ocorrência de fraude (NÖRNBERG.; TONDO.; BRANDELLI., 2009, ALVIM, 1992).

Andrade *et al.* (2010) analisaram amostras de bebidas lácteas fermentadas com adição de soro de queijo na proporção de (0, 10, 20 e 40%) respectivamente. Foi observada uma alta correlação ( $p < 0,0001$ ) entre os resultados de porcentagem de soro e índices de CMP, ou seja, o índice de CMP acompanha proporcionalmente a porcentagem de soro lácteo adicionado.

Tabela 3: Níveis médios de CMP por mg/L em amostras de leite pasteurizado por mesorregiões de Minas Gerais.

Região	n	Média	Desvio	Mediana	Mínimo	Máximo
		CMP	Padrão CMP			
Centro-Oeste	4	5,3	72,9	5,3	4,5	6,3
Metropolitana	29	82,8	0,7	21,7	0,0	430,0
Noroeste	4	17,8	120,0	17,7	5,6	30,0
Sul de Minas	4	5,2	11,4	5,1	3,3	7,1
Zona da Mata	5	7,6	1,9	8,3	2,2	12,1
Alto Paranaíba/Triângulo	10	492,1	387,3	386,4	9,7	1167,0
Total	56	133,4	248,3	19,2	0,0	1167,0

Estudos realizados por Friedrich *et al.* (2010) demonstraram que o leite “in natura” congelado por um período de 33 dias, obteve índices de CMP na concentração de 6,0 e 11,31 mg L<sup>-1</sup>. Os autores concluíram que não houve aumento significativo, no índice de CMP, acima do permitido pela legislação, para as amostras de leite que são congeladas antes da análise.

Closs e Souza (2011) analisaram amostras de leite UAT de diferentes procedências e tempo de armazenamento (após o envase, um, dois, três e quatro meses). Verificou-se que o teor de CMP aumenta com o tempo e

que apenas um mês de armazenamento já foi suficiente para a concentração de CMP ser superior a 30 mg.L<sup>-1</sup>. O extremo de valor detectado foi de 208 mg.L<sup>-1</sup> em uma amostra com quatro meses de armazenamento. Pode-se descartar o congelamento como fator interferente nos elevados níveis de CMP encontrados, já que o tempo máximo de congelamento foi 2 semanas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Villanoeva *et al.* (2014), que avaliaram a temperatura (21°C, 6°C, e -12°C) e tempo de armazenamento (dia da amostragem, 30, 60, 90 e 120) do leite UHT em relação ao

índice de CMP. Um aumento progressivo do índice CMP em leite UHT, medido por meio de CLAE, foi observado com o aumento da temperatura e tempo de armazenamento. As amostras armazenadas a -12°C apresentaram menos alterações nos níveis de CMP, confirmando que, se o armazenamento for necessário, o congelamento de amostras de leite UHT para uma análise posterior é a melhor opção, quando não for possível a análise imediatamente após produção.

#### **4.1.1 Fraude por adição de soro de queijo ao leite pasteurizado em laticínios sob diferentes Sistema de Inspeção**

Durante o estudo também foi analisado o percentual de amostras em relação ao total

para o tipo de Inspeção em que as amostras eram submetidas. Do total de amostras analisadas, 73% foram provenientes do Serviço de Inspeção Federal (S.I.F), 13% do Instituto Mineiro de Agropecuária (I.M.A) e 14% não possuíam sistema de fiscalização (S.F) (Fig., 11).Dentre as amostras do S.I.F, 68,3 % estavam aptas para o consumo direto e 31,7% estavam acima de 30mg/L de CMP. Em amostras processadas em estabelecimentos com inspeção estadual e sem inspeção 71,4% e 62,5%, respectivamente, estavam conformes enquanto 28,6% e 37,5%% deveriam ser destinadas para reaproveitamento (consumo animal ou indústria química) (Fig., 12).

Figura 11. Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE de acordo com o tipo de inspeção no estado de Minas Gerais (n= 56).

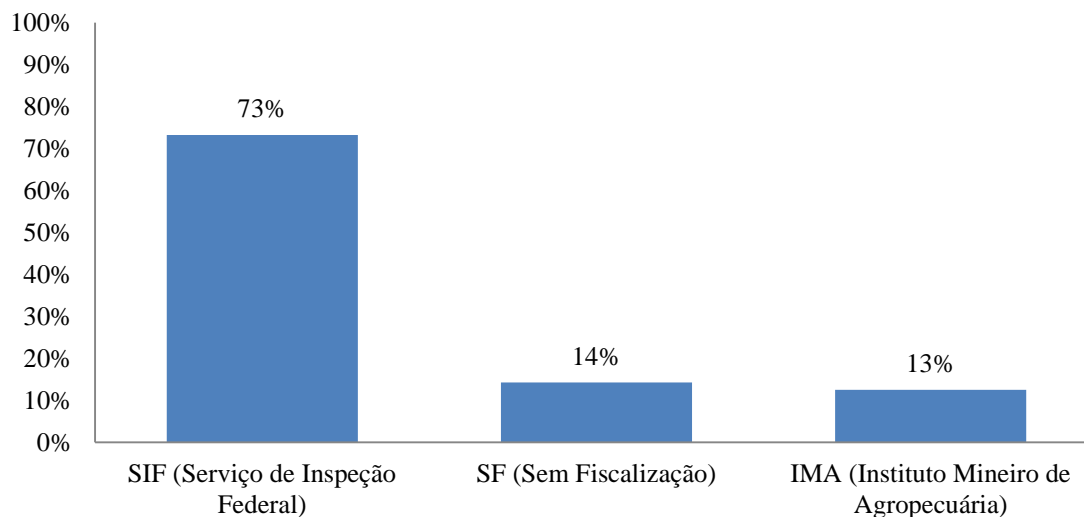
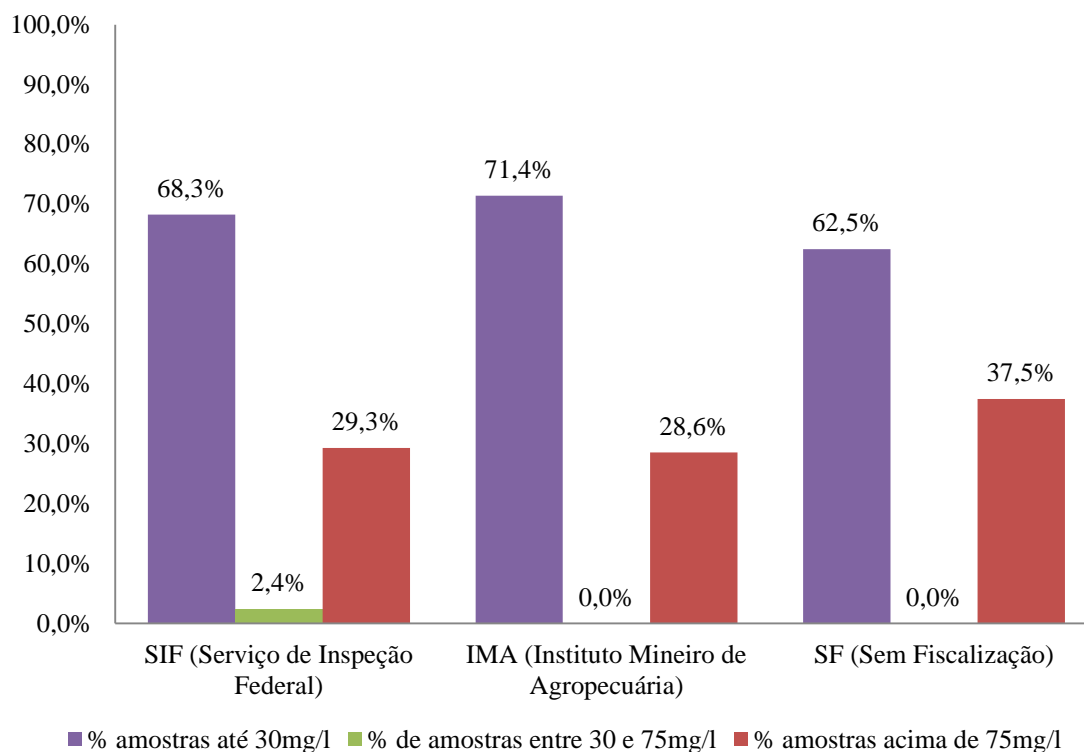


Figura 12. Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE em relação ao índice de CMP e tipo de inspeção no estado de Minas Gerais (n= 56).



A região Sudeste do país possui o maior percentual de leite formal em relação as outras regiões, ou seja, produção de leite sob inspeção federal, estadual ou municipal, seguido das regiões Sul e Centro-Oeste. De acordo com a Embrapa (2012), a produção sob inspeção em todo país, de janeiro a junho de 2012, cresceu em torno de 4,4% em relação ao mesmo período em 2011.

Uma mudança drástica no sistema de produção leiteira foi o processo de resfriamento do leite na propriedade e a granelização, inicialmente fomentada pelos grandes laticínios, culminando com a implantação da IN n° 51/2002 do MAPA, que de forma geral, estabeleceu parâmetros para as características físico-químicas e definiu limites de contagem de bactérias e contagem de células somáticas, assim como requerimentos de ausência de micro-organismos patogênicos, ausência de conservantes, químicos e de resíduos de antibióticos, pesticidas ou outras drogas. Porém essa Instrução Normativa já foi revogada e substituída pela IN n°62 do

MAPA (Brasil, 2011) diante das dificuldades de implantação da mesma. Essa medida aumentou os prazos, definindo um novo cronograma para adaptação gradativa dos produtores, e alterou os limites da Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS). A IN n°62, no entanto, instituiu uma Comissão Técnica Consultiva pelo MAPA, que terá o papel de avaliar as ações voltadas para a melhoria da qualidade do leite o Brasil (SILVA, 2012). Essa mudança tem sido importante para que o Brasil se torne auto suficiente e passe da condição de importador para exportador de peso no mercado. Essa regulamentação incentivou o aumento do consumo formal de leite no país, por parte de pequenos e médios laticínios (FAGUNDES, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007b. Entretanto, segundo Carvalho *et al.*, 2007b a estrutura de inspeção no país não tem sido suficiente para coibir fraudes em determinados produtos e até mesmo a própria informalidade. No presente trabalho nota-se que tanto nas amostras com sistema de inspeção (estadual e federal) e naquelas

sem inspeção, a fraude por adição por soro de queijo ao leite ocorreu. Os cuidados com a qualidade do leite, desde a produção até a industrialização devem ser intensificados,

assim como o controle fiscal deve ser revisado com maior frequência e adequado à realidade atual (FURTADO, 2010).

Tabela 4: Distribuição das amostras de leite pasteurizado em relação às mesorregiões de Minas Gerais e o tipo de inspeção (n=56).

Regiões	Quantidade	Tipo de Inspeção
	9	SIF
Alto Paranaíba/	1	IMA
Triângulo	0	SF
	4	SIF
	0	IMA
Centro-oeste	0	SF
	19	SIF
	4	IMA
Metropolitana	6	SF
	3	SIF
	1	IMA
Noroeste	0	SF
	2	SIF
	0	IMA
Sul de Minas	2	SF
	4	SIF
	1	IMA
Zona da Mata	0	SF
Total	56	-

#### **4.1.2. Fraude por adição de soro de queijo ao leite e relação com o tipo de empresa**

As indústrias responsáveis pelo processamento do leite podem ser do tipo Cooperativas em que os produtores são os donos do empreendimento e seus interesses são representados pela direção e conselho administrativo ou empresas de capital, do tipo particular (MARASCHIN; WAQUIL, 2014).

Das marcas analisadas no estudo, 59% do total de amostras eram do tipo Cooperativa e 41% era do tipo particular (Fig.13). A figura abaixo (Fig.14), mostra que do total de amostras analisadas, 70% provenientes de Cooperativas encontram-se aptas ao abastecimento direto enquanto 3% deveria ser destinado a derivados lácteos e 27% não poderia ser destinado a alimentação humana. Das amostras provenientes de empresas particulares, 65% dessas estão com índices de CMP até 30mg/l e 35% acima de 75mg/L.



Figura 13. Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE em relação ao tipo de empresa em Minas Gerais (n=56).

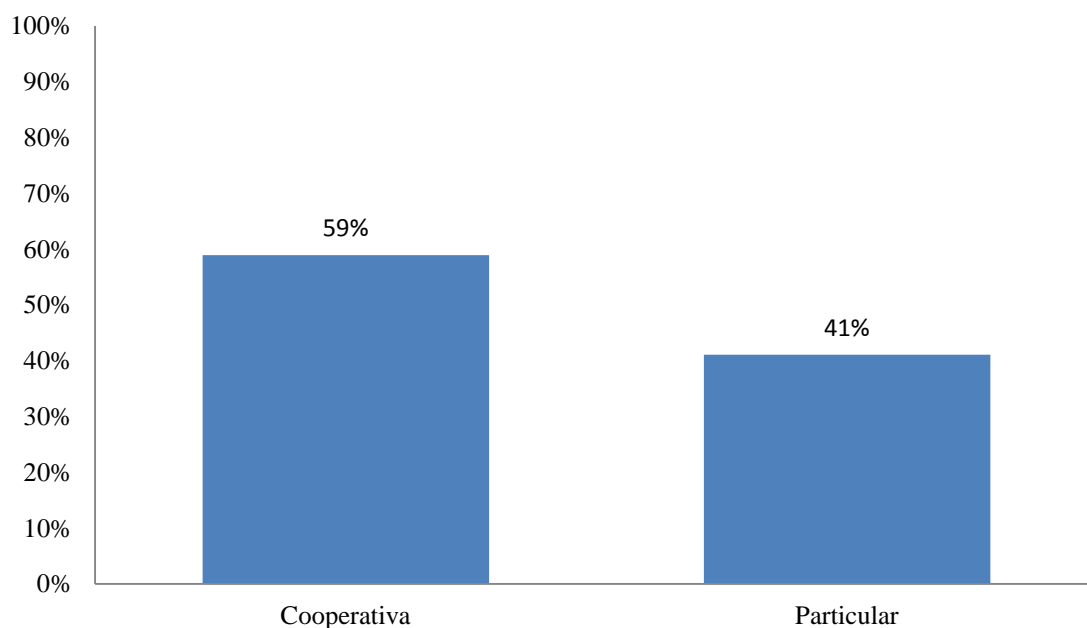
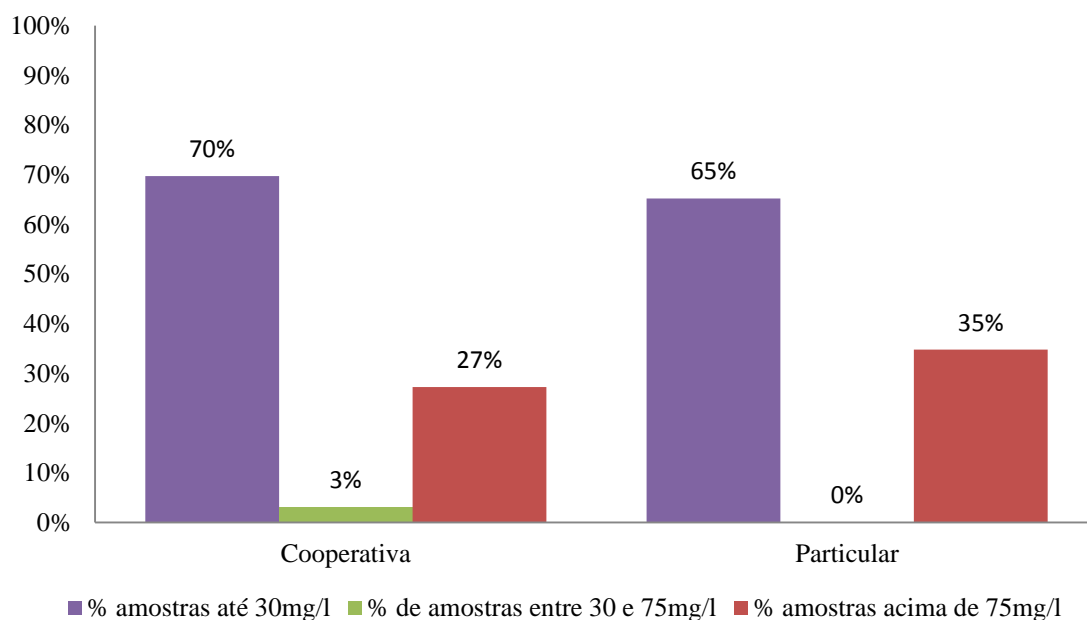


Figura 14. Percentual de amostras de leite pasteurizado analisadas por CLAE em relação ao índice de CMP e tipo de empresa no estado de Minas Gerais. (n=56).



De acordo com Carvalho *et al.*, 2007b, em 2003 aproximadamente 40% do leite inspecionado no Brasil, era captado por cooperativas. Sendo que em 2005, cinco das

dez maiores empresas captadoras de leite eram cooperativas. Segundo os mesmos autores, estas também estão sujeitas às mesmas forças de mercado que as empresas

com outra estrutura de capital, até mesmo as grandes multinacionais. Por essa razão, necessitam de programas de gestão adequados, inovação de produtos e processos, custos compatíveis com o mercado, além de prezar sempre pela qualidade de seus produtos e matéria-prima. Aquelas que não acompanharem as mudanças no mercado perderão, fatalmente, seu espaço e sua credibilidade. No presente estudo amostras provenientes de cooperativas, apresentaram um percentual relativamente menor de leites com índices de CMP acima de 30mg/L, ou seja, não

aptas ao abastecimento direto quando comparadas às amostras provenientes de empresas particulares.

#### 4.2. Correlação das características físico-químicas e índice de CMP nas amostras comerciais de leite pasteurizado

Na Tabela 5 encontram-se os resultados de médias e desvio padrão das análises físico-químicas das amostras de leite pasteurizado e na Tabela 6 encontram-se os resultados de médias e desvio padrão das análises físico-químicas das amostras de leite pasteurizado por mesorregiões de MG.

Tabela 5. Média e desvio padrão das análises físico-químicas (proteína, gordura, acidez titulável, pH, densidade e crioscopia) das amostras de leite pasteurizado coletadas em no estado de Minas Gerais (n=29).

Parâmetros Físico-químicos	Média	Desvio Padrão
Proteína (g/100g)	3,0	0,3
Gordura (g/100g)	2,9	0,6
Acidez titulável	14,1	2,5
pH	6,6	0,1
Densidade (g/mL)	1,030	0,0
Crioscopia (°C)	- 0,496	0,250

Tabela 6. Média e Desvio-padrão das análises físico-químicas (proteína, gordura, acidez titulável, pH, densidade e crioscopia) das amostras de leite pasteurizado por mesorregiões do estado de Minas Gerais (n=29).

REGIÕES	Média e Desvio Padrão						
	n	Proteína (g/100g)	Gordura (g/100g)	Acidez. Tit	pH	Densidade (g/mL)	Crioscopia (°C)
Alto Paranaíba/Triângulo	9	3,1 ± 0,3	2,9 ± 1,1	14,3 ± 1,4	6,6 ± 0,1	1,032 ± 0,0	-0,496 ± 0,199
Centro-Oeste*	1	3	2,8	17,3	6,6	1,032	-0,514
Metropolitana	16	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3	13,9 ± 3,1	6,5 ± 0,2	1,030 ± 0,0	-0,492 ± 0,318
Noroeste	3	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2	13,8 ± 0,7	6,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	-0,491 ± 0,133
Total	29	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,6	14,1 ± 2,5	6,6 ± 0,1	1,030 ± 0,0	-0,496 ± 0,0

\* Como essa região possui apenas 1 amostra a média foi dada como valor da amostra e o desvio padrão não é calculado nesse caso

Foi realizada análise estatística com o método não paramétrico para amostras independentes para verificar se as médias de

dados analisados (CMP, gordura, proteína, sólidos totais, crioscopia, acidez titulável e densidade) são significativamente diferentes em nível de 95% de confiança entre as regiões. Notou-se que os índices de CMP (p

= 0,02) e proteínas ( $p= 0,017$ ) foram diferentes entre as regiões.

O teste de correlação de Spearman não demonstrou correlação significativa ( $p>0,05$ ) entre os índices de CMP e as outras variáveis (gordura, proteína, sólidos totais, crioscopia, acidez titulável e densidade) (Tab. 7).

Resultados diferentes foram encontrados por Villanoeva *et al.* (2014) que avaliaram a acidez titulável do leite UHT em relação ao

tempo de armazenamento, temperatura, contagem de micro-organismos mesófilos e índice de CMP. Foi encontrada baixa correlação (29,6%) entre a acidez titulável e contagem de mesófilos. No entanto, a correlação entre níveis de CMP e acidez titulável foi alta (69%), indicando o congelamento como o melhor método para preservar amostras de leite UHT em relação ao índice de CMP. Porém, não foi observada correlação significativa no índice de CMP e o pH.

Tabela 7. Coeficiente de correlação de Spearman entre as variáveis de composição centesimal de amostras de leite pasteurizado no estado de Minas Gerais (n=29).

Parâmetros		CMP	Gordura	Proteína	Sólidos Totais	Crioscopia	pH	Acidez Titulável	Densidade
CMP	coeficiente de correlação	1	0,22	-0,279	0,063	-0,161	0,13	0,35	-0,35
	Significância		0,251	0,135	0,742	0,404	0,5	0,858	0,063
Gordura	coeficiente de correlação	0,22	1	0,294	0,383*	0,283	-0,16	0,191	0,94
	Significância	0,251		0,121	0,04	0,145	0,417	0,331	0,634
Proteína	coeficiente de correlação	0,279	0,294	1	0,11	0,465*	0,281	0,272	0,56**
	Significância	0,135	0,121		0,562	0,011	0,14	0,153	0,002
Sólidos Totais	coeficiente de correlação	0,063	0,383*	0,11	1	-	0,019	0,365	-0,023
	Significância	0,742	0,04	0,562			0,922	0,052	0,907
Crioscopia	coeficiente de correlação	0,161	0,283	0,465*	0,37*	1	0,046	0,745**	0,21
	Significância	0,404	0,145	0,011	0,048		0,811	0	0,274
pH	coeficiente de correlação	0,13	-0,16	0,281	-0,019	0,046	1	-0,19	0,011
	Significância	0,5	0,417	0,14	0,922	0,811		0,322	0,957
Acidez Titulável	coeficiente de correlação	0,35	0,191	0,272	0,365	0,745**	-0,19	1	0,168
	Significância	0,858	0,331	0,153	0,052	0	0,322		0,383
Densidade	coeficiente de correlação	-0,35	0,94	0,56**	-0,023	0,21	0,011	0,168	1
	Significância	0,063	0,634	0,002	0,907	0,274	0,957	0,383	

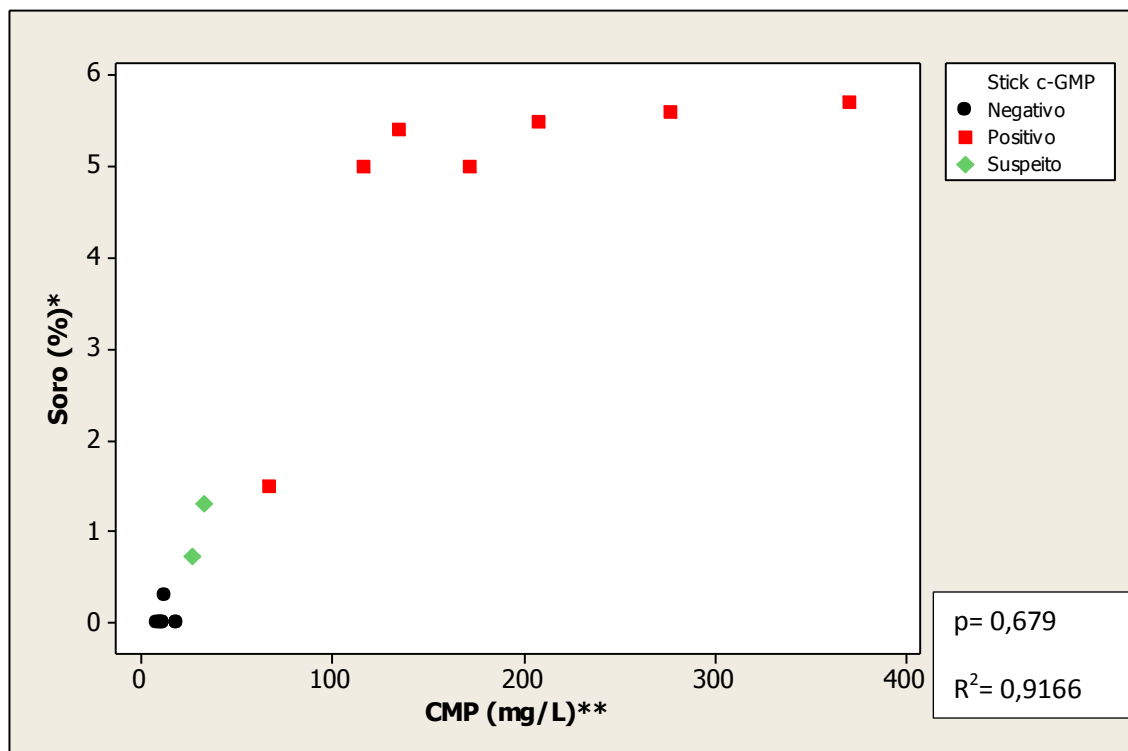
Correlação é significativa ao nível de 0,05\*. Correlação é significativa ao nível de 0,01\*\*.

### 4.3. Comparação entre os métodos Stick cGMP, BRW Elisa e CLAE-FG

A figura 15 mostra o resultado das análises do Stick cGMP, BRW Elisa em comparação

com o método de referência CLAE-FG. As amostras consideradas suspeitas no Stick cGMP passaram por confirmação pelos métodos BRW Elisa e CLAE-FG.

Figura 15. Amostras de leite pasteurizado analisadas pelos métodos cromatográficos (CLAE) e imunológicos (Stick c-GMP e BRW Elisa) no estado de Minas Gerais (n=18).



\*Soro (%) de acordo com o método BRW EIA (ELISA), \*\*CMP por CLAE, Stick c-GMP

Como ilustrado acima o valor de  $p$  ( $> 0,05$ ) indica que não houve diferença entre o resultado encontrado pelo método Stick c-GMP e o esperado de acordo com o valor de CMP pelo método CLAE. O procedimento descrito é uma ferramenta útil para determinação de CMP em leite, podendo ser utilizada como método de triagem rápido e eficiente no combate à fraude econômica pela adição soro de queijo ao leite e produtos lácteos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Hernández *et al.* (2009) que analisaram 60 amostras de leite cru pelo Stick cGMP e os resultados obtidos foram comparados pela CLAE e pelo método colorimétrico do ácido siálico. Os resultados obtidos pelos três

métodos foram semelhantes, sendo que soro de queijo foi encontrado em 75% das amostras. O Stick cGMP detectou corretamente 33 amostras contendo soro de queijo em quantidade superior a 4% de acordo com os resultados da CLAE, embora duas amostras com um teor de soro de queijo entre 4,5 e 5,6%, respectivamente, só apresentaram resultados fracamente positivo. Por outro lado, o método colorimétrico do ácido siálico detectou cinco resultados falso-negativos com amostras contendo mais do que 4% de soro de queijo. Resultados falso-negativos foram encontrados em cerca de 50% das amostras tanto no Stick cGMP quanto no métodos do ácido siálico, quando o a concentração de soro de queijo foi entre 2 e 2,5% de acordo

com a CLAE e resultados falsos-positivos não foi detectado. Neste estudo o Stick cGMP mostrou-se um método mais confiável que método colorimétrico do ácido sialíco.

Oancea (2009) utilizou o Stick cGMP para detecção de soro de queijo em amostras comerciais de leite (cru, pasteurizado, UHT, UHT enriquecido com ômega-3, condensado e em pó) e bebidas lácteas. Os resultados revelaram a presença de altos teores de GMP em 70% das amostras investigadas. O método utilizado no presente estudo foi considerado de fácil aplicação e interpretação.

## 5. CONCLUSÃO

A pesquisa da fraude por adição de soro de queijo ao leite pasteurizado comercializado em algumas mesorregiões de Minas Gerais, através da determinação do índice de CMP por CLAE, permitiu constatar que grande parte das amostras pesquisadas apresentaram irregularidades, com valores de CMP acima do permitido pela legislação.

Os métodos alternativos imunoquímicos (Stick c-GMP e BRW ELISA) apresentaram detecção de CMP de acordo com os valores obtidos por meio do método cromatográfico CLAE.

A utilização de métodos alternativos ao CLAE, a exemplo dos kits baseados em técnicas imunoquímicas pode ser uma ferramenta viável como estratégia de triagem para controle mais rigoroso e frequente de fraudes por adição de soro de queijo ao leite.

## 6. REFERÊNCIAS

ABLV. Associação Brasileira do Leite Longa Vida. Leite Longa Vida está Presente em 87% dos lares Brasileiros. 2009. Disponível em:< <http://www.ablv.org.br/25-Releases-Leite-Longa-Vida-esta-presente-em-asp>>. Acesso em 27 de maio de 2014.

ALVIM, T. C. *Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho: Filtração Gélida (GF-HPLC)*.

1992. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

ANDRADE, E. H. P. *Qualidade físico-química, microbiológica e detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em bebidas lácteas fermentadas*. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

ANDRADE, E. H. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R; FONSECA, L. M. *et al*. Use of caseinomacropéptide by high performance liquid chromatography to estimate cheese whey addition in fermented milk beverages. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 606-607, 2010.

AYALA, A. R.; LEÓN, S. V.; FLORES, G. P. *et al*. Aplicación de três métodos analíticos para la detección de suero de quesería em leche UHT comercializada em la ciudad de México. *Interciencia*, v. 34, n. 6, p. 406-412, 2009.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 8.078, de 11 de set. 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de set.1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria n. 124, 23 set. 1991. Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. *Diário Oficial da União*, 20 nov. 1991, p. 26245-6.

BRASIL. 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, DF, 20 de setembro de 2002.

BRASIL. Instrução Normativa nº68, de 12 de dez. 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para

Controle de Leite e Produtos Lácteos, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Instrução Normativa nº69, de 13 de dez. 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 nº68, de 12 de dezembro de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, 15 dez. 2006. Seção 1, p. 67.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal: RIISPOA: e outras legislações de interesse do DIPOA/SDA*. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. 381 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 dez. 2011.

BREMER, M. C. E. G.; KEMMERS-VONCKEN, A. E.M.; BOERS, E. A. M. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 294-302, 2008.

CARDOSO, R. R. *Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração*. 2006. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARVALHO, B. M. A. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. *Revista Eletrônica de Veterinária*, v. 8, n. 6, 2007a.

CARVALHO, M. P. *Cenário para o leite no Brasil em 2020*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007b, 190 p.

CORTEZ, M. A.S.; DIAS, V. G.; MAIA, R. G. *et al.* Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 65, n. 376, p.18-25, 2010.

CLOSS, E.; SOUZA, C. F. V. Avaliação do teor de caseinomacropeptídeo (CMP) nos leites cru e UAT ao longo do tempo de armazenamento. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, Campo Mourão, v.2, n.2, p.111-119, jul./dez., 2011.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 47, n. 2, p.96-100, 1992.

DAMODARAN, S; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de alimentos de Fennema*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, n.7, p. 21-25, 1998.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Produção de leite no Brasil. *Conjuntura do mercado lácteo*, Juiz de Fora, v. 5, n. 44, p.1-5, out.2012

EUROPROXIMA. *A microtiter plate based competitive enzyme immunoassay (EIA) for screening of the presence of bovine rennet whey proteins in milk powder*. Arnhem: [20-]. 15p.

Estado de Minas Gerais. Mesorregiões do IBGE. Disponível em: <http://www.mg.gov.br/governomg/ecp/cont>

[ents.do?evento=conteudo&idConteudo=69547&chPlc=69547&termos=s&app=governo mg&tax=0&taxn=5922.](https://www.gov.br/brasil/pt-br/assuntos/seguranca-alimentar/controle-de-qualidade/controle-de-fraudes-em-leite-cru)> Acesso em: 10 fev. 2014.

FAGUNDES, M.H. Uma nova etapa da Instrução Normativa nº51: Região Centro-Sul. *Revista de Política Agrícola*, Brasília, v. XV, n. 2, p. 33- 47, Abr./Maio/Jun. 2006.

FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L. *et al.* Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 65, n. 376, p. 5-11, 2010.

FONSECA, R.A.; ZOCCAL, R. Produção de leite em Minas Gerais e na Zona da Mata mineira. *Panorama do Leite on-line*, v.3, n. 27, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/especial27.html>>. Acesso em: 06 fev. 2013.

FREITAS, J. R. F.; LIMA, V. A. M.; LIMA, R. S. *et al.* Ensinando sobre adulteração do leite: Relato de uma experiência utilizando materiais alternativos. *Revista Eletrônica de Extensão*, Florianópolis, v. 8, n. 11, p. 116-130, 2011.

FRIEDRICH, M. T.; FRANKEN, R. B. C.; AZEVEDO, M. S. *et al.* Avaliação da estabilidade do leite in natura e UHT quanto ao índice de CMP. *Revista CIATEC UPF*, Passo Fundo, v. 2, n. 1, p.21-27, 2010.

FUKUDA, S.P. *Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite*. Campinas, 1994. 142 f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FUKUDA, S. P.; ROIG, S. M.; PRATA, L. F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Lait*, v. 84, p. 501-512, 2004.

FURLANETTI, A.M.; PRATA, L. F. Free and total GMP (glicomacropéptide) contents of milk during bovine lactation. *Ciência*

*Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, p.121-125, 2003.

FURTADO, M. A. M. Fraudes em leite de consumo. In: I SIMPÓSIO DE QUALIDADE DO LEITE E DERIVADOS, 2010, Seropédica. Anais... Seropédica: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. 2010.

HERNÁNDEZ, C. M., MUÑOZ. M., DAURY. C., *et al.* Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. *International Dairy Journal*, v.19, p. 205–208, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Indicadores IBGE*. [s.l]: 2013. 70 p. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201204\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201204_publ_completa.pdf)>. Acesso em: 06 fev. 2014.

KASEMSURAN, S.; THANAPASE, W.; KIATSOONTHON, A. Feasibility of Near-Infrared Spectroscopy to Detect and to Quantify Adulterants in Cow Milk. *Analytical Sciences*, v.23, p.907-910, 2007.

LASMAR, M. M.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M. *et al.* Detection of cheese whey in raw milk preserved with bronopol through high performance liquid chromatography. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, p. 1553-1558, 2011.

LEITE, M. O.; OLIVEIRA, M. C. P. P. ; FONSECA, L. M. *et al.* Use of caseinomacropéptide index as indicator of adulteration of milk powder in Brazil. In: 2012 Annual Meeting - American Dairy Science Association & American Society of Animal Science, 2012, Phoenix, AZ. *Journal of Dairy Science*, v. 95, Supplement 2. Champaign, IL: American Dairy Science Association (ADSA), 2012. v. 95. p. 22-22.

LEITE, M. T. *Otimização da produção de ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por Lactobacillus helveticus*.

(Doutorado). Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006. 96p.

MAFUD, M. D.; ROSSI, R. M.; CAMPOS, E. M. *et al.* Não conformidade na cadeia produtiva do leite: Problemas institucionais. In: CONGRESSO DA SOBER, XLV, 2007, Londrina. *Anais...* Londrina: UEL, 2007. p. 1-16.

MAGALHÃES, M. A. *Determinação de fraude de leite com soro de leite pela análise de cmp e pseudo-cmp por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção por espectrometria de massa.* 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

MARASCHIN, A. M., WAQUIL, P. D., *As relações entre produtores de leite e cooperativas: um estudo de caso da bacia leiteira de Santa Rosa-RS.* [20--]. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/12/04O207.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014

MAWSON, A. J. Bioconversion for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, v. 47, n. 3, p. 195-203, 1994.

MOTTA, T. M.C.; HOFF, R. B. Determinação de CMP em soro de queijo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA: A QUÍMICA E A SUSTENTABILIDADE, 49., 2009, Porto Alegre. *Anais eletrônicos...* Porto Alegre: Associação Brasileira de Química, 2009. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2009/trabalhos/4/4-469-6824.htm>>. Acesso em: 2 abr. 2012.

NÖMBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotólicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, n.2, p. 157-163, 2009.

OANCEA, S. Identification of glycomacropptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. *Romanian*

*Biotechnological Letters*, v. 14, n.1, p. 4.146-4.151, 2009.

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

OLIVEIRA, E. N. A., SANTOS, D. C., OLIVEIRA, A. S. *et al.* Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 409-415, out./dez. 2010

OLIVEIRA, G. B.; GATTI, M. D. S.; VALADÃO, R. C. *et al.* Detecção da adição fraudulenta de soro de queijo em leite: interferência da atividade de proteases bacterianas. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”*, n. 367/368, p. 56-65, 2009.

PESQUISA detecta alto nível de soro no leite. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 25 fev. 2003. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/fsp/dinheiro/fi2502200332.htm>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

PILA, J. Como e onde tem crescido a pecuária leiteira na região Sudeste. Bebedouro: Scot Consultoria, 2013. Disponível em: <<http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/32629/como-e-onde-tem-crescido-a-pecuaria-leiteira-na-regiao-sudeste.htm>>. Acesso em: 17 de fev. 2014.

PROTEÍNAS do leite. Disponível em: <<http://www.foodinfo.net/es/protein/milk.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; FANDIÑO, R. L *et al.* Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, v. 10, p. 333-338, 2000.

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



SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; MOREIRA, G. N. *et al.* Evolução da proteólise do leite inoculado in vitro com *Pseudomonas fluorescens*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 313-320, 2010.

SILVA, R. O. P. Instrução Normativa nº62: uma decisão consciente para o setor lácteo. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, v. 7, n. 2, 2012. Disponível em: <<ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/AIA/AIA-09-2012b.pdf>>.

SIQUEIRA, K. B.; MERCÊS, E. S.; PINHO, M. C. O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo. *Panorama do Leite*, Juiz de Fora, v.6, n.65, p. 5-6, fev. 2013. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013\\_02\\_PanoramaLeite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf)>. Acesso em: 06 fev. 2014.

SOUZA, C. M. *Validação e comparação de metodologias analíticas empregadas na determinação de CMP em leite*. 2007. 60 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

TREMARIN, A. *Condições operacionais na hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana*. 2007, 104p. (Mestrado). Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. *et al.* Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 609-615, 2002.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; JUNIOR, O. D. R. *et al.* Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, n.4, p.698-704, 2005.

VILLANOEVA, C. N. B. C.; ANDRADE, E. H. P.; BAFFA JUNIOR, J. C. *et al.* Caseinomacropéptido index in UHT whole

milk stored under different conditions of temperature and time. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*, v.66, n.1, p.289-296, 2014.

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

ZARAGOZA, SPAIN. *Stick cGmp: para la detección de glicomacropéptido de caseína em leche*. OPERON, S.A. Zaragoza, 2010. 6p.