

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE O MÉTODO DA NINIDRINA
ÁCIDA E A CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
PARA A DOSAGEM DE GLICOMACROPEPTÍDEO E
CASEINOMACROPEPTÍDEO EM LEITE**

SANDRA PEREIRA FUKUDA
Médica Veterinária

Prof. Dr. SALVADOR MASSAGUER ROIG
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título
de Doutora em Tecnologia de Alimentos

**CAMPINAS - SP
2003**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

F955e Fukuda, Sandra Pereira
Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite / Sandra Pereira Fukuda. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Salvador Massaguer Roig
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Leite. 2.Fraude. 3.Ácido siálico. 4.Cromatografia líquida de alta eficiência. I.Roig, Salvador Massaguer. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig

DTA / FEA / UNICAMP

Orientador

Prof. Dr. Luiz Francisco Prata

DMVP / FCAV / UNESP

Membro

Prof^a. Dr^a. Mirna Lucia Gigante

DTA / FEA / UNICAMP

Membro

Dr. Paulo Roberto Nogueira de Carvalho

ITAL

Membro

Dr. Leonardo Ettore do Vale

ITAL

Membro

Dr^a. Leila Maria Spadoti

Membro

Prof. Dr^a. Heloisa Mascia Cechi

DCA / FEA / UNICAMP

Membro

Ação de Graças

É maravilhoso, Senhor, ter braços perfeitos,

Quando há tantos mutilados!

Meus olhos perfeitos,

Quando há tantos sem luz!

Minha voz que canta,

Quando tantas emudeceram!

Minhas mãos que trabalham,

Quando tantas mendigam!

É maravilhoso voltar para casa,

Quando tantos não têm para onde ir!

É maravilhoso:

Amar, viver, sorrir, sonhar!

Quando há tantos que choram,

Odeiam, revolvem-se em pesadelos,

Morrem antes de nascer.

É maravilhoso ter um Deus para crer,

Quando há tantos que não têm

O Consolo de uma crença.

É maravilhoso Senhor, sobretudo,

Ter tão pouco a pedir,

Tanto a agradecer

*Ao Rubens,
companheiro de longa jornada,
onde juntos tanto aprendemos,
onde juntos tanto construímos,
onde juntos, agora, colhemos os nossos frutos!*

*Gastei uma hora pensando em um verso
que a pena não quer escrever.
No entanto ele está cá dentro
inquieta, vivo.
Ele está cá dentro
e não quer sair.
Mas a poesia deste momento
inunda minha vida inteira.*

(Carlos Drummond de Andrade)

Aos meus filhos Thiago, Frances e Livia

“Um dia, uma pequena abertura apareceu num casulo. Um homem sentou e observou a borboleta por várias horas. Ela se esforçava...então, pareceu que ela tinha parado de fazer qualquer progresso. Parecia que ela tinha ido o mais longe que podia, e não conseguia mais. Então o homem decidiu ajudar a borboleta: pegou uma tesoura e cortou o restante do casulo. A borboleta saiu, finalmente. Mas seu corpo estava murcho, era pequeno e tinha as asas amassadas. O homem continuou observando a borboleta, porque ele esperava que a qualquer momento, as asas dela se abrissem e esticassem, para serem capazes de suportar todo o corpo e que iria se firmar com o tempo. Nada aconteceu! Na verdade, a borboleta passou o resto da vida rastejando com um corpo murcho e asas encolhidas. Ela nunca foi capaz de voar. O que o homem, em sua gentileza e vontade de ajudar não compreendia, era que o casulo apertado é o esforço necessário à borboleta para passar através da pequena abertura. Era o modo que Deus fazia com que o fluido do corpo da borboleta fosse para as suas asas, de modo que ela estaria pronta para voar, uma vez que estivesse livre do casulo. Algumas vezes, o esforço é justamente o que precisamos em nossa vida. Se Deus nos permitisse passar através de nossas vidas, sem quaisquer obstáculos, nós não iríamos ser tão fortes como poderíamos ter sido. Nós nunca poderíamos voar...”

ACREDITANDO QUE SÓ SE ENSINA PELO EXEMPLO !

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, seus conhecimentos, suas idéias claras e sua ampla visão técnica, certamente foram decisivos para que eu pudesse atingir meu objetivo; agradeço-lhe por todo o apoio, compreensão, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Prata do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Campus de Jaboticabal, disponível em todos os momentos, grande incentivador, não mediu qualquer esforço para a execução deste trabalho; agradeço-lhe pelo apoio, carinho, amizade e experiência transmitida.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Campus de Jaboticabal, por ter autorizado o uso das instalações e equipamentos para a realização de parte dos experimentos práticos.

Ao Dr. Tomas de Aquino Porfírio, Chefe do Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) de Pedro Leopoldo-MG, por ter autorizado a utilização das instalações e equipamentos para realização de parte dos experimentos práticos.

Ao Dr. Celso Versiani Velloso, Chefe do Serviço de Inspeção de Leite e Derivados (SELEI), do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pelo constante apoio, incentivo e principalmente por ter disponibilizado as colunas cromatográficas, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Dr^a. Silvana Vasconcelos Cançado e ao Dr. Sérgio Dracz do LARA pela gentileza e atenção especial com que me receberam, pela dedicação empreendida e pelo suporte técnico concedido durante toda minha permanência em Pedro Leopoldo.

À Dr^a. Josefa Abucater Lima e ao assistente técnico João Carlos Teodoro do LARA, pela disponibilidade e valiosa participação na realização das análises cromatográficas.

Ao Dr. Francisco Sérgio Ferreira Jardim, Delegado da Delegacia Federal da Agricultura em São Paulo (DFA/SP) e à Dr^a. Vera Lucia Braga Izidoro, Chefe Substituta do Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPA), por terem autorizado minha participação no curso de pós-graduação.

À Cidinha do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal, pela colaboração inesgotável prestada durante a realização da parte prática do trabalho.

Aos Agentes de Inspeção Sanitária do Serviço de Inspeção Federal (SIF), Sebastião, Israel e Antonio de Franca, Moacir de Catanduva, Miguel de Votuporanga e Leila de Barretos, pela preciosa colaboração na coleta das amostras.

Aos colegas médicos veterinários do SIF, Dr.Hugo Verardino pelo apoio prestado durante a conservação das amostras e à Dr^a.Leila da Silva Martins, Dr.Denimarcos Ferreira Leite, Dr^a.Daniela Zantedeschi, Dr.Odair José Alessi, Dr. Paulo César Porto e Dr.José Marcio Luis Gomes, por terem autorizado e facilitado a coleta das mesmas.

Às diretorias das empresas Usina de Laticínios Jussara S/A, Só-Nata Comércio e Indústria de Leite, Laticínios Matinal e Instituto Tecnológico e Científico Dr. Roberto Rios (Intec), por terem autorizado a coleta de amostras em suas unidades.

À minha cunhada Rubia por ter sempre me recebido carinhosamente em sua “pensão” quando da minha estadia em Campinas.

À Frances e ao Marcos pelo assessoramento nos cálculos estatísticos.

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

ÍNDICE

Assunto	Página
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
RESUMO GERAL	xxiii
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	03
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
Revisão Bibliográfica	07
1. Ação enzimática do leite.....	10
1.1. Enzimas psicotróficas	11
2. Métodos de monitoração da atividade enzimática.....	15
2.1. Método da Ninidrina Ácida para determinação de ácido siálico	17
2.2. Método da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE para determinação de macropeptídeos	18
3. Estocagem refrigerada de leite cru.....	21
4. Ação do congelamento sobre o leite	24
5. Referências Bibliográficas	33
CAPÍTULO II - CORRELAÇÃO DA METODOLOGIA DA NINIDRINA ÁCIDA COM A CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – PARA AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO AO LEITE	43
Resumo	45
Summary	45
1. Introdução	47
2. Material e Métodos	51
2.1 Metodologia Analítica.....	53

2.1.1 Método da Ninidrina Ácida.....	53
2.1.2. Método CLAE	53
3. Resultados e Discussão	54
4. Conclusão	71
5. Referências Bibliográficas.....	71

CAPÍTULO III - ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE PESQUISA DE PROTEÓLISE EM LEITE UAT	75
Resumo	77
Summary	77
1. Introdução	79
2. Material e Métodos.....	83
2.1. Metodologia Analítica.....	85
2.1.1. Método da Ninidrina Ácida.....	85
2.1.2. Método CLAE	85
3. Resultados e Discussão	86
4. Conclusão	104
5. Referências Bibliográficas.....	104

CAPÍTULO IV – EFEITO DO CONGELAMENTO DE AMOSTRAS DE LEITE PARA REALIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DO MÉTODO DE NINIDRINA ÁCIDA NA PESQUISA DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE SORO	107
Resumo	109
Summary	109
1. Introdução	110
2. Material e Métodos.....	116
2.1 Metodologia Analítica.....	117

2.1.1. Método da Ninidrina Ácida	117
2.1.2. Método CLAE	118
3. Resultados e Discussão	119
4. Conclusão	128
5. Referências Bibliográficas	129
CONCLUSÃO GERAL	133
ANEXO (A A G)	135

LISTA DE TABELAS

Tabela..... Página

CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Delineamento experimental realizado em amostras de leite cru com e sem adição de soro de leite em quantidades variáveis e submetidas aos testes de ninidrina ácida e CLAE 52
- Tabela 2 - Valores encontrados pelo método da ninidrina ácida (em absorbância a 470nm) em leite cru sem e com adição de quantidades variáveis de soro de leite e em diferentes concentrações finais de ácido tricloroacético (TCA)..... 57
- Tabela 3 – Valores encontrados pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em leite cru sem e com adição de quantidades variáveis de soro de leite e na concentração final de 8% de ácido tricloroacético (TCA)..... 59

CAPÍTULO III

- Tabela 1 – Características do leite cru quando do seu recebimento na planta beneficiadora de leite UAT..... 87
- Tabela 2 – Resultados de leite cru resfriado submetidos às metodologias de ninidrina ácida e CLAE, com cálculo pela equação da reta da altura do pico esperada, com intervalo de confiança de 95% 88
- Tabela 3 – Valores encontrados pelo método da ninidrina ácida e pela cromatografia líquida de alta eficiência para leite cru e UAT correspondente durante o prazo de validade comercial..... 91
- Tabela 4 – Evolução dos resultados (médias e desvios) das provas de ninidrina ácida e CLAE com significância determinada pelo teste de Tuckey a 5%, em leite UAT 103

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Características do leite cru quando do seu recebimento na planta beneficiadora de leite UAT.....	119
Tabela 2 – Valores encontrados pelo método da ninidrina ácida e pela cromatografia líquida de alta eficiência, em análises realizadas em amostras de leite antes e após o processamento por ultra alta pasteurização e após congelamento por 24 horas e 1 mês.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Correlação entre adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da ninidrina ácida, utilizando a concentração de 8% de TCA e leitura espectrofotométrica a 470nm..... 61
- Figura 2 – Correlação entre adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da ninidrina ácida, utilizando a concentração de 10% de TCA e leitura espectrofotométrica a 470nm..... 61
- Figura 3 – Correlação entre adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da ninidrina ácida, utilizando a concentração de 12% de TCA e leitura espectrofotométrica a 470nm..... 63
- Figura 4 – Correlação entre adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando a concentração de 8% de TCA e leitura da altura do pico..... 63
- Figura 5 – Correlação entre os métodos da ninidrina ácida com concentração final de 8% de TCA e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na pesquisa de fraudes por adição de soro ao leite..... 67

Figura 6 – Correlação entre os métodos da ninidrina ácida com concentração final de 10% de TCA e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na pesquisa de fraudes por adição de soro ao leite	67
Figura 7 – Correlação entre os métodos da ninidrina ácida com concentração final de 12% de TCA e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na pesquisa de fraudes por adição de soro ao leite	69

CAPÍTULO III

Figura 1 – <i>a, b, c, d, e, f</i> e <i>g</i> - Comparação dos resultados dos experimentos I a VII obtidos pelas metodologias da ninidrina ácida e do CLAE para leite cru e UAT no dia da produção e pelo prazo de vida comercial correspondentes	95
---	----

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Variação da absorbância na pesquisa do teor de ácido siálico detectada pelo método da ninidrina ácida em leite submetido ao processo de congelamento: a: leite cru, b: leite UAT.	123
Figura 2 - Variação da altura do pico do CMP detectado pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência em leite submetido ao processo de congelamento: a: leite cru, b: leite UAT.	125

RESUMO GERAL

O método da ninidrina ácida utilizando a espectrofotometria na região visível do espectro, a 470nm, para a determinação quantitativa de ácido siálico livre ou ligado ao glicomacropéptido - GMP da κ -caseína na pesquisa de fraude de adição de soro de queijo ao leite fluido, além de ser de fácil execução, tem se mostrado eficiente na rotina laboratorial. Neste trabalho, esse método foi comparado com a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, internacionalmente aceita para a quantificação do caseinomacropéptido – CMP, devido à sua precisão na detecção da presença fraudulenta de soro no leite. No entanto, na proteólise também ocorre aumento dos teores de GMP/CMP livres e sua detecção poderia ser através das metodologias citadas acima. Em diversas circunstâncias amostrais (leite cru e leite adicionado intencionalmente com soro em diferentes proporções), os métodos se correlacionaram, apresentando, para um intervalo de confiança de 95%, um valor de r igual a 0,981, quando no método de ninidrina ácida se utilizou a desproteínização do leite com ácido tricloroacético - TCA na concentração final de 12%. Quando se alterou a concentração final de TCA para 10% e 8%, foram obtidos valores de r iguais a 0,992 e 0,993, respectivamente. Comparou-se também os níveis de GMP e CMP encontrados no leite UAT durante o período de processamento e estocagem, partindo-se de leite cru, do leite UAT logo após a ultrapasteurização e, mensalmente, até o final de seu prazo de validade. Observou-se inicialmente uma queda dos níveis de GMP e CMP livres em ambos os métodos, entre os leites crus e recém processados, seguida de aumento significativo dos mesmos, com o decorrer do prazo de validade. O coeficiente de correlação determinado entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de 0,965, mostrando a elevada correspondência, confirmado pelo coeficiente de determinação da ordem de 0,93. No Brasil, as amostras de leite remetidas para análises de cromatografia líquida de alta eficiência, para detecção de fraude por adição de soro, são congeladas logo após

a colheita. No estudo do efeito do congelamento em leite cru e UAT correspondente e possível influência deste processo nos valores de CMP e ácido siálico/GMP obtidos pelas metodologias de CLAE e da ninidrina ácida, respectivamente, observou-se um aumento dos valores obtidos entre o leite cru sem congelar e o congelado por 1 dia, com tendência a diminuir quando a estocagem congelada foi estendida. Para o leite UAT a tendência foi de queda suave e contínua.

Palavras-chave: Leite. Fraude. Adição de soro. Ácido siálico. Proteólise. Ninidrina ácida. CLAE. Congelamento.

INTRODUÇÃO

O leite, além de alimento completo, constitui matéria prima de extrema versatilidade tecnológica, advinda de sua própria composição, cujos constituintes, isoladamente ou em conjunto, proporcionam a obtenção de imensa gama de derivados. Grande parte desses derivados decorre das suas frações protéicas que, embora não possua uma quantidade expressiva de proteínas quando comparado com outros produtos de origem animal, é capaz de originar derivados altamente protéicos como os queijos.

A proteólise é o processo que governa grande parte das mudanças da matéria-prima leite, possibilitando a obtenção de produtos altamente especializados e diferenciados. Todavia, do mesmo modo que ela pode ser tecnologicamente utilizável e desejável, pode também ser altamente indesejável e responsável por defeitos, tanto na matéria prima quanto nos derivados fluidos de longa vida de prateleira como os submetidos ao processo de ultra-alta temperatura - UAT.

A proteólise no leite pode ser provocada por suas enzimas nativas como a plasmina, por enzimas adicionadas principalmente durante a fabricação de queijos, como, por exemplo, a renina ou por enzimas produzidas pela flora contaminante que pode chegar ao leite através de ordenha realizada em condições inadequadas de higiene ou pelos utensílios mal lavados utilizados durante a sua coleta ou pela falta de asseio do ordenhador.

Com a implantação em larga escala da refrigeração do leite nas fazendas e o decorrente aumento do tempo entre a coleta e a sua chegada nos estabelecimentos processadores, reveste-se de suma importância o controle de microrganismos normais e contaminantes, em especial os da flora psicotrófica.

Pelos estudos já realizados, pode-se perceber que a ação das enzimas citadas, principalmente as proteases extracelulares dos psicotróficos, promovem ação proteolítica bem similar àquela da renina na primeira fase da coagulação do

leite durante a fabricação de queijos, fato que também pode ser comprovado na geleificação do leite UAT.

O método da ninidrina ácida (determinação quantitativa de ácido siálico por espectrofotometria na região visível) mostrou-se eficiente para a detecção de adição de soro de queijo ao leite fluido e tem se mostrado útil na monitoração da atividade proteolítica do leite por quantificar, indiretamente, a liberação de glicomacropéptido (GMP). Na fabricação de queijos, a fração GMP, liberada com o soro do queijo, é resultante da hidrólise da κ -caseína pela ação do coalho (quimosina) e processo idêntico ocorre em caso de proteólise do leite cru, pasteurizado ou esterilizado.

O presente trabalho, ao correlacionar o método da ninidrina ácida com a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, método oficial para quantificação do GMP, tem por objetivo verificar se ambos os métodos respondem similarmente tanto para detecção de fraude por adição de soro ao leite fluido (pasteurizado e UAT) como também para a identificação de proteólise.

OBJETIVOS

O presente trabalho foi dividido em três fases, com o intuito de alcançar os seguintes objetivos:

- Correlacionar, em várias circunstâncias amostrais (leite cru, leite adicionado intencionalmente de soro em diferentes proporções), o método da ninidrina ácida, utilizado para quantificar espectrofotometricamente o teor do ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico, com o método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, método oficial para quantificação do glicomacropéptido (GMP) ou caseinomacropéptido (CMP).
- Estudar o comportamento do método da ninidrina ácida e da cromatografia líquida de alta eficiência durante a estocagem do leite UAT, partindo-se do leite cru, recém processado e durante os meses referentes ao prazo de validade.
- Verificar a influência do congelamento do leite cru e do leite UAT nos valores de ácido siálico e CMP, uma vez que as amostras são remetidas congeladas para a análise cromatográfica.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A principal proteína do leite, a caseína, está presente na forma de micelas, que são complexos esféricos contendo 92% de proteína e 8% de sais inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio (FOX, 1992).

As caseínas são muito suscetíveis à proteólise porque contêm estruturas ao acaso, de pouca organização espacial, representadas por pequena quantidade de estruturas secundárias do tipo helicoidal (CROMIE, 1992). As micelas possuem uma estrutura porosa devido à sua composição em submicelas, sendo que essas estão ligadas ao fosfocaseinato de cálcio. O modelo aceito atualmente é aquele em que o teor da κ -caseína nas submicelas varia e que as deficientes em κ -caseína estão localizadas no interior das micelas, enquanto as ricas em κ -caseína estão concentradas na superfície, dando às micelas uma camada rica em κ -caseína com alguma α_{s1} - α_{s2} e β -caseínas também expostas na superfície. Esse modelo sugere que a região hidrofílica C-terminal da κ -caseína projeta-se para a superfície, dando às micelas uma aparência “pilosa”. Esta camada “pilosa” é responsável pela estabilidade da micela e, se for removida, a sua estabilidade coloidal é destruída e ela coagula ou precipita (FOX & McSWEENEY, 1998).

Quando o leite é estocado a baixas temperaturas, a β -caseína se dissocia da micela e a quantidade de caseína solúvel pode aumentar em até 30%, sugerindo que a refrigeração pode fazer com que as frações da caseína se tornem mais suscetíveis à proteólise (CROMIE, 1992).

A κ -caseína encontra-se na forma de uma mistura de polímeros unidos por ligações dissulfídicas intermoleculares, com peso molecular de 19.000Da e 169 resíduos de aminoácidos (CHEFTEL et al., 1989). É uma fosfoproteína contendo aproximadamente 6-10% de carboidratos, consistindo de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico ou NANA), galactose (GAL) e N-acetilgalactosamina (GALNAC). Os carboidratos estão na forma de tri ou

tetrassacarídeos localizados na parte C-terminal da molécula, unido pela ligação O-treonil principalmente à Treonina – 131 da κ -caseína. O número de oligossacarídeos por molécula de κ -caseína varia de 0 a 4. A variação da glicosilação resulta no mínimo em 9, e provavelmente em 10, formas moleculares de κ -caseína. (FOX & McSWEENEY, 1998). Segundo Saito & Itoh (1992), essa seqüência de açúcares pode ser:

NANA α 2-3 – GAL β 1-3 GALNAC β 1 – Tirosina/Serina

GAL β 1-3 (NANA α -2-6) GALNAC β 1 – Tirosina Serina

NANA α 2-3 GAL β 1-3 (NANA α 2-6) GALNAC β 1-Tirosina/Serina

A κ -caseína é a fração das caseínas insensível ao cálcio e, em condições normais, desempenha um importante papel na estabilidade da micela, impedindo a precipitação da α_s e β -caseína, em presença daquele íon (SHAMMET et al., 1992). Essa propriedade estabilizadora é perdida durante a coagulação enzimática pela renina. Somente a κ -caseína é hidrolisada durante a fase primária da ação da renina ou quimosina (EC 3.4.23.4), especificamente no sítio de clivagem entre os aminoácidos Phe₁₀₅ – Met₁₀₆. Esta ligação é muitas vezes mais suscetível à hidrólise por proteinases ácidas (as reninas comerciais são proteinases ácidas) do que por aquelas do sistema protéico do leite (FOX, 1989).

Na clivagem inicial por ação da renina há, portanto, a formação de dois peptídeos, sendo um deles composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105, designado de para- κ -caseína e o outro do resíduo 106 a 169, que, por carrear todos os açúcares da κ -caseína, é conhecido como glicomacropéptido (GMP), sendo que um desses açúcares é o ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico. A κ -caseína é heterogênea, apresentando 2 variantes genéticas A e B, podendo o teor de carboidratos na molécula variar de 0 a 15% e, como há a possibilidade de se obter fragmentos com ausência glucídica, o peptídeo terminal pode ser chamado de macropéptido ou caseinomacropéptido (CMP) (GUINEE & WILKINSON, 1992).

Geralmente as proteinases bacterianas também atacam a κ -caseína produzindo a para- κ -caseína, resultando na desestabilização da micela e uma hidrólise acentuada da κ -caseína provoca a coagulação do leite. O ataque preferencial à κ -caseína é esperado, pois essa fração está localizada na superfície da micela e acessível à degradação inicial. As α e β -caseínas são também atacadas, sendo a β -caseína mais suscetível que a α -caseína. As caseínas são subsequentemente degradadas em polipeptídeos de pequeno peso molecular e aminoácidos. Algumas proteinases bacterianas atacam as caseínas em ordens de preferência diferentes da acima citada, porém as proteínas do soro não são degradadas (CROMIE, 1992).

Embora a hidrólise da κ -caseína por outras proteinases ácidas que não a quimosina bovina seja estudada, assume-se que todo o coalho comercial hidrolisa a ligação PHE-MET. Entretanto, a agregação característica das micelas pelos coalhos substitutos difere daquela tratada pela quimosina, indicando diferenças na extensão ou especificidade da hidrólise da κ -caseína (FOX, 1989).

Samuelson et al, 1966 apud Bengtsson et al. (1973) mencionaram três razões para explicar a coagulação do leite tratado pelo processo UAT. Uma delas seria que as proteínas são desnaturadas pelo aquecimento, havendo a formação do complexo caseína- β -lactoglobulina capaz de formar agregados que sedimentam levando à coagulação. Outra razão poderia ser que parte do ácido siálico da κ -caseína é liberada pela ação do aquecimento, resultando na perda do efeito estabilizante desta fração em relação à caseína, que coagula juntamente com o cálcio. Finalmente, a terceira seria que parte das enzimas proteolíticas do leite é reativada e isto causa a coagulação. Essa enzima reativada pode derivar de enzimas nativas do leite ou de enzimas intracelulares de microrganismos destruídos e autolisados durante o tratamento UAT.

A geleificação do leite UAT é causada pela ação de enzimas termorresistentes, cujo mecanismo é similar à coagulação do leite pela renina. Como consequência dessa similaridade entre a ação proteolítica das proteases

bacterianas psicrotróficas e a coagulação pela renina pode-se esperar que, durante a estocagem refrigerada do leite cru, a concentração do ácido siálico solúvel aumente, especialmente se for por vários dias (ZALAZAR et al., 1993).

Recio et al. (2000) relataram que os principais peptídeos oriundos da ação de proteinases de bactérias psicrotróficas sobre a κ -caseína foram separados por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) e eletroforese capilar (CE) e identificados por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS). Houve coincidência com produtos de degradação previamente encontrados em leite UAT estocado. Os resultados demonstraram que as proteinases psicrotróficas hidrolisam a caseína na ligação 105-106, levando à formação do CMP, apesar de serem menos específicas que a quimosina e também clivam as ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108. Desse modo, a presença de CMP em leite UAT pode não ser considerada exclusivo indicador de adulteração do leite com soro, apesar da medida da área dos picos do cromatograma das diferentes formas *CMP-like* presentes, possibilitar a detecção do acréscimo de sólidos de soro.

1. AÇÃO ENZIMÁTICA NO LEITE

As enzimas são os catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. A característica distintiva de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade ou fenda, na estrutura molecular da enzima chamada *sítio ativo*. A molécula que se liga ao sítio ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de substrato (LEHNINGER et al., 1995).

As enzimas são divididas em 6 categorias principais. As oxirredutases catalisam reações de oxidorredução que envolvem a perda ou ganho de elétrons. As transferases catalisam a transferência de um grupo funcional, tal como um grupo amina, de uma molécula para outra. As hidrolases catalisam hidrólise, a reação de um substrato com água. As liases catalisam a quebra (ou formação) de

ligações duplas, tais como aquelas entre dois átomos de carbono e um de oxigênio (grupo carbonila) ou um átomo de carbono e um de nitrogênio. As isomerases catalisam reações de isomerização tal como a conversão de glicose em frutose. As ligases catalisam a formação de uma ligação entre um átomo de carbono e outro átomo – O, S, N ou um segundo átomo de carbono (UCKO, 1992).

A enzima proteolítica hidrolisa uma determinada ligação peptídica somente se a especificidade da enzima é satisfeita pelos resíduos de aminoácidos na proximidade da ligação suscetível do substrato. As enzimas proteolíticas dividem-se em endopeptidases e exopeptidases, dependendo da preferência da enzima por hidrolisar ligações peptídicas no interior ou na porção final do peptídeo (WHITAKER, 1994).

Outro modo de classificar as proteases é pela natureza química do sítio ativo. Baseado neste conceito, Hartley (1960) apud Yamamoto (1975) propôs a classificação em 4 grupos. O primeiro grupo contém as serino-proteases que tem um resíduo seril específico em seu sítio ativo. Essas enzimas são todas endopeptidases. Fazem parte desse grupo a tripsina, a quimotripsina e a elastase. O segundo grupo contém enzimas sulfidrílicas cuja atividade depende da presença de um ou mais grupos sulfidrílicos no sítio ativo. O terceiro grupo contém metaloenzimas cuja atividade depende da presença de metais, usualmente relacionados estequiometricamente com a molécula protéica. Os metais podem ser Mg, Zn, Co, Fe, Hg, Cd, Cu ou Ni. O quarto grupo contém proteases ácidas, isto é, a presença de dois grupos carboxílicos no sítio ativo e que são ativas entre os pH 2 a 4.

1.1. ENZIMAS PSICOTRÓFICAS

O uso de refrigeração tem sido adotado em todos os níveis de processamento do leite na indústria. A introdução de tanques isotérmicos nas fazendas permite estocar o leite de várias ordenhas. A descentralização de postos

de leite permitiu o seu transporte refrigerado em caminhões-tanque a longas distâncias (GARG, 1990). A estocagem de leite cru em baixa temperatura por 4-5 dias é comum em países desenvolvidos (FOX, 1989).

A estocagem de leite cru refrigerado em fazendas ou em plantas industriais tem sido uma prática largamente usada na última década na Argentina. Como conseqüência, problemas relacionados com o crescimento da microflora mesofílica ácido-láctica foram muito reduzidos, além de que o custo do transporte diminuiu e a uniformidade do leite remetido aos processos industriais foi melhorada (REINHEIMER et al., 1990).

Essas condições, entretanto, selecionam o desenvolvimento de organismos psicotróficos, os quais tem considerável potencial de deterioração. A maioria das bactérias psicotróficas não é patogênica, mas quando cresce no leite ou produtos lácteos pode produzir uma variedade de aromas e sabores desagradáveis. Muitas bactérias psicotróficas produzem proteinases e lipases estáveis ao calor capazes de sobreviverem aos tratamentos térmicos comerciais ainda que as bactérias produtoras dessas enzimas sejam destruídas. Mesmo em baixa concentração, essas enzimas são capazes de produzir lipólise e proteólise em leite e seus derivados (LAW, 1979).

Em geral, a mesma espécie de bactéria produz ambas as enzimas. As proteinases psicotróficas são produzidas por uma série de organismos, mas aqueles significativos na deterioração do leite são predominantemente bastonetes Gram-negativos. Proteinases extracelulares são também produzidas por psicotróficos formadores de esporos, mas esses não tem sido associados a deterioração do leite. Os organismos proteolíticos são, na maioria, espécies de *Pseudomonas*, mas há outros gêneros como *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Xanthomonas* e *Cytophaga* (LAW, 1979). As enzimas de *Pseudomonas* são as mais estudadas devido à predominância dessa espécie no leite cru estocado sob refrigeração (CROMIE, 1992).

As proteinases extracelulares e lipases de *Pseudomonas* psicotróficas são reconhecidas como enzimas da deterioração microbiana primária. A síntese

dessas enzimas extracelulares ocorre numa larga faixa de temperaturas de crescimento, mas a maioria dos estudos indica que o ótimo para a síntese ocorre entre 20°C e 30°C para as proteinases e lipases da *P. fluorescens*. Considerável síntese de enzimas extracelulares também ocorre a temperaturas abaixo da faixa ótima, por exemplo, a produção das proteinases por *P. fluorescens* a 5°C foi de 55% da encontrada a 20°C (CROMIE, 1992).

As proteinases de psicrófilos são, geralmente, classificadas como metaloproteinases. Zinco e cálcio estão associados com a enzima e admite-se como sendo parte integral da estrutura e do sítio ativo da molécula. A maioria das proteinases psicrófilas é extremamente termoestável e pode resistir aos tratamentos térmicos HTST (alta temperatura curto tempo) e UAT (ultra-alta temperatura). A estabilidade térmica é medida pelo valor **D**, que é o tempo necessário a uma determinada temperatura para causar uma redução de 90% da atividade da enzima. Os valores **D** a 74°C e a 140°C para a proteinase da *Pseudomonas sp.* são respectivamente de 304 minutos e 1 minuto (CROMIE, 1992).

Garg (1990) cita que Candiotti isolou de leite cru 306 amostras de bactérias psicrófilas e que a 5°C, 33% mostraram-se proteolíticas e 48% lipolíticas, com 16% mostrando ambas as atividades. A 25°C a proteólise foi menos comum. Cita o relato de Nuhas e Samaras em leite pasteurizado no qual o número de lactobacilos e leveduras aumentaram quase na mesma proporção durante estocagem a 3-4°C por 9 dias, mas o número de *Pseudomonas spp.*, inicialmente muito menor que os outros grupos, aumentou muito rapidamente, alcançando valores similares àqueles dos lactobacilos e leveduras.

Segundo Fox (1989), as bactérias psicrófilas, aparentemente, não são significativas quanto à proteólise a menos que a população exceda 10⁶ ufc/ml.

Law (1979) mostrou que *Pseudomonas* e *Acinetobacter* na faixa de 10⁷ ufc/ml ou acima produzem proteinase suficiente para degradar a caseína em extensão detectável por eletroforese em gel de poliácridamida. As β e κ-caseínas estão largamente degradadas em leite UAT geleificado e as proteínas do soro são,

geralmente, resistentes às proteases psicrotróficas embora Adams et al. (1976) afirmem que certas cepas hidrolisem a κ -caseína a baixas populações (aproximadamente 10^4 ufc/ml). Mitchell & Marshall apud Law (1979) demonstraram também a especificidade do substrato das proteinases termoestáveis de *Pseudomonas fluorescens* e que as proteinases extracelulares tem maior atividade sobre as caseínas que pelas proteínas do soro. Janzen et al. apud Law (1979) trabalhando com leite pasteurizado, encontraram que a atividade relativa das proteases foi significativamente maior em leite desnatado que em leite integral, talvez porque o leite desnatado, de algum modo, protege a enzima da desnaturação pelo aquecimento. Ledford apud Fox (1989) relatou que amostras positivas para coliformes têm contagens de psicrotróficos maiores, em contagens padrão em placas e modificadas (21°C/25 horas), que amostras coliforme-negativas. O crescimento de coliformes pode influenciar o crescimento de pseudomonas psicrotróficas em amostras comerciais.

Zalazar et al. (1993), trabalhando com contagens totais de microrganismos mesofílicos e psicrotróficos, com determinação do teor de ácido siálico e características da coagulação pela renina em amostras de leites cru e termizados (65°C por 4 minutos) e ambos estocados por 6 dias a 5°C, afirmaram que o aumento do teor de ácido siálico solúvel durante a estocagem refrigerada do leite pode ser usado como um indicador da ação proteolítica de bactérias psicrotróficas sobre o leite.

Guamis et al. (1987), trabalhando com três cepas altamente proteolíticas, estudaram suas ações sobre o leite utilizando a técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE adaptado para leite, com a vantagem de usar leite integral ao invés de precipitado de caseína, possibilitando a averiguação simultânea das alterações em todas as proteínas do leite. Observaram que, em amostras inoculadas com *Pseudomonas fluorescens*, após 3 dias a 7°C, houve degradação quase completa da κ e β -caseínas e considerável redução da α_{s1} -caseína. No densitograma realizado nos géis obtidos no PAGE, um pico, provavelmente de para- κ -caseína, aparece após 3 dias e aumenta ao longo do

período de incubação (21 dias), após o qual completa proteólise foi observada. *Flavobacterium sp.* causou pequena modificação nas proteínas do leite após 3 dias a 7º C. Verificou-se que acima de 6 dias, a β -caseína foi parcialmente degradada e após 21 dias somente foram identificados pequenos picos de produtos de degradação, juntamente com o pico da para- κ -caseína. Um padrão similar foi observado em amostras inoculadas com *Citophaga sp.*; após 21 dias constatou-se que todas as caseínas, exceto a α_{s1} -caseína, haviam desaparecido.

Os psicotróficos são potencialmente a causa mais importante de produtos com baixa qualidade, constituindo-se como fator limitante do tempo de estocagem do leite cru com os atuais procedimentos de manipulação. Tem-se dito que a pressão comercial e econômica dentro da indústria de laticínios continuará pelo aumento do intervalo entre a ordenha e o processamento do leite, ao mesmo tempo em que os consumidores exigirão melhor qualidade dos produtos lácteos. Portanto, a presença e atividade dos psicotróficos no leite cru e seus efeitos prejudiciais no processamento dos produtos lácteos terão uma maior significância no futuro (CROMIE, 1992).

2. MÉTODOS DE MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Um dos métodos utilizados para monitorar a ação coagulante baseia-se na determinação do ácido siálico, um indicador específico da liberação do GMP (LÉONIL & MOLLÉ, 1991).

Inúmeros autores têm se dedicado a desenvolver métodos para a determinação do NANA em leite. Em 1981, a Comunidade Econômica Européia (CEE) oficializou dois métodos, o primeiro para a determinação do ácido siálico e o segundo, para a determinação dos glicomacropéptídeos – GMP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Zalazar et al. (1990) afirmaram que o aumento do teor de ácido siálico durante a estocagem de leite pode ser usado como um indicador de ação proteolítica por bactérias psicotróficas.

Nakano & Ozimek (1999) estudando o GMP por cromatografia em gel, relataram que a maior parte do ácido siálico presente na fração não dialisável de soro doce era constituída por GMP-ácido siálico, concluindo que a determinação deste açúcar é importante para estimar a concentração de GMP presente. Em decorrência, examinaram três técnicas (diálise, cromatografia em gel e cromatografia de troca iônica) para remover substâncias interferentes encontradas no soro doce e para determinar a concentração do ácido siálico total e GMP nas amostras e suas frações.

O estudo do comportamento do ácido siálico em leite inoculado com cultura de *Pseudomonas* e tratado termicamente pelo sistema VTIS (método direto de aquecimento) no qual ocorreu geleificação, evidenciou um aumento da quantidade de ácido siálico no soro. Nenhum aumento de ácido siálico em soro de leite não inoculado e tratado pelo sistema citado foi observado durante o mesmo período de tempo. Como a decomposição da caseína foi muito maior do que a das proteínas do soro, isso indicou que a primeira a ser atacada pela enzima foi a caseína. O ataque das proteases resultou em coagulação do leite inoculado e tratado pelo sistema VTIS e em aumento da quantidade de ácido siálico. Isto significa que as proteases atacaram a caseína no mesmo lugar na κ -caseína, como na ação da renina. Tanto a coagulação quanto o aumento de ácido siálico no leite inoculado e tratado puderam, portanto, ser atribuídos à atividade enzimática desenvolvida pela cultura de pseudomonas (BENGTSSON et al., 1973)

No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Portaria n. 124 de 23/09/91 (BRASIL, 1991) aprovou dois métodos analíticos de detecção de soro em leite, um quantitativo para a determinação de GMP através da técnica de CLAE e outro qualitativo, baseado na pesquisa de ácido siálico, metodologia esta adaptada por Wolfschoon-Pombo & Pinto (1985) utilizando o reativo de Ehrlich.

2.1. MÉTODO DA NINIDRINA ÁCIDA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO

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, utilizando como cromóforo a ninidrina ácida (Reagente 2 de Gaitonde).

No mesmo ano, Fukuda et al. propuseram a padronização do método da ninidrina ácida para a determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico (NANA) livre ou ligado à glicoproteína de leite fluido e soro, na região do visível do espectro, a 470nm. O método mostrou-se exato, preciso e sensível a pequenas variações, ao redor de 2%. Aliando-se a essas características, a facilidade de execução, com grande possibilidade de aplicação rotineira por não envolver materiais e equipamentos sofisticados ou mão de obra qualificada, além de reduzir o tempo de execução quando comparado com outras metodologias, por dispensar a hidrólise a quente.

Pelos resultados obtidos, Fukuda et al. (1996) propuseram a utilização do método da ninidrina ácida como um teste de “*screening*” para a classificação do leite recebido pelas indústrias de laticínios quanto à possível fraude por adição de soro, classificando-o como negativo (absorbância a 470nm $\leq 0,300$ ou $\leq 5,14\mu\text{g}$ Nana livre/ml de leite), suspeito (absorbância a 470nm entre 0,300 e 0,600 ou entre 5,14 a 10,64 μg Nana livre/ml de leite) ou positivo (absorbância a 470nm $> 0,600$ ou $> 10,64\mu\text{g}$ Nana livre/ml de leite).

Recentemente, Furlanetti & Prata (dados ainda não publicados), estudaram as variações dos teores de GMP livre e total (após coagulação da amostra com renina comercial) no leite bovino durante a lactação, utilizando o método da ninidrina ácida, padronizado por Fukuda et al. (1994), e concluíram que as formas livre e total do GMP variam de acordo com o período da lactação, as condições sanitárias do úbere e é inversamente proporcional à produção do leite. O GMP livre tem teor mais alto quando próximo do período colostrado e durante o final da

lactação, enquanto o GMP liberado pela renina mostra um comportamento similar, porém sendo seu teor dez vezes maior que o GMP livre.

Gomes (1995) estudando a atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite UAT, concluiu que o método da ninidrina ácida mostrou-se eficiente para monitorar alterações precoces da κ -caseína durante o armazenamento de leite UAT comercial e sob a ação da plasmina e de extratos de pseudomonas. Houve uma correlação linear razoável ($r=0,77$) entre o controle e o leite adicionado de plasmina e que foi superior ($r=0,81$) entre o controle e a adição de plasmina mais extrato de pseudomonas, confirmando a sensibilidade do método para detectar modificações proteolíticas sob a κ -caseína.

Prata (2002), ampliando o universo amostral, constatou que o método da ninidrina ácida é eficiente na definição de fraudes por adição de soro, modificando os valores sugeridos por Fukuda et al. (1996) nas diversas categorias: negativo ($A_{470nm} \leq 0,300$ ou $\leq 5,14$ mg NANA/litro de leite), suspeito ($0,300 < A_{470nm} \leq 0,450$ ou $5,15$ a $7,89$ mg/l) e positivo ($A_{470nm} \geq 0,451$ ou $> 7,89$ mg NANA/litro de leite).

A técnica da ninidrina ácida para a determinação quantitativa de ácido siálico foi homologada como metodologia oficial no Brasil, através da Instrução Normativa n.22 de 14/04/03 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003) que regulamentou os Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos.

2.2. MÉTODO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE PARA A DETERMINAÇÃO DE MACROPEPTÍDEOS

Entre os métodos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. A cromatografia é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases

permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre a duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes conjuntos (COLLINS et al., 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS et al., 1997).

Van Hooydonk & Olieman (1982) descreveram o uso da cromatografia líquida de alta eficiência, para determinar a quantidade de GMP liberado pela ação da quimosina no leite, como método rápido, sensível e facilmente automatizado, apresentando cromatogramas de amostras de leite genuíno e intencionalmente adicionado de soro de leite, nos quais se identificavam 4 picos seqüenciais: (1) pico "background" não identificado, (2) GMP, (3) pico indicativo de excessiva atividade de proteases bacterianas e (4) TCA.

Olieman & Bedem (1983) verificaram que a proteólise por enzimas bacterianas pode causar um aumento do teor de GMP. Mottar et al. (1985) também observaram que bactérias psicrófilas Gram-negativas produzem enzimas proteolíticas termorresistentes que alteram o cromatograma do CLAE na determinação do valor do GMP.

Mehrens & Reimerdes (1986), utilizando os cromatogramas da CLAE para estimar o GMP liberado da κ -caseína e separado do filtrado de TCA de leite em pó desnatado, sem e com adição de soro em pó, obtiveram 0,7% como limite de detecção de soro adicionado.

Olieman & Bedem (1983), aplicando o método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, compararam o comportamento cromatográfico de leite cru

com menos de 24 horas de obtenção com leite cru estocado por 4 dias a 5-7° C. Houve um aumento do componente atribuído à formação do GMP e esse pico apresentou, após um certo nível de proteólise, uma cisão em decorrência de uma alteração no tempo de retenção. O aumento deste último componente foi atribuído à formação de certos peptídeos que são típicos da atividade de proteinases bacterianas.

Mottar et al. (1985), correlacionando contagem total de bactérias, contagem de psicotróficos, contagem de microrganismos Gram-negativos e teor de ácido siálico, medido espectrofotometricamente pela complexação com o resorcinol, com os componentes de lise da proteína de amostras de leite cru refrigerado de diferentes idades e qualidades microbiológicas, analisadas por CLAE, observaram que: (a) proteólise em leite pode ser causada por proteinases do próprio leite e/ou bacterianas; a contribuição de proteinases nativas do leite para a formação dos componentes citados por Olieman & Bedem (1983) é pequena em comparação com as de origem bacteriana; (b) esses componentes são formados em alto nível pela atividade das bactérias presentes no leite; (c) o nível de proteínas lisadas foi maior pela ação dos psicotróficos Gram-negativos do que pela flora bacteriana como um todo, levando a concluir que os psicotróficos Gram-negativos são responsáveis pela produção de enzimas proteolíticas; (d) o nível de ácido siálico tem alta correlação com os 2 produtos proteolíticos formados e que esse nível deve ser no máximo de 4.000 µg/kg, pois em concentrações maiores há perigo de presença de enzimas bacterianas termorresistentes e isso afetar a vida de prateleira de leite UAT elaborado a partir dessa matéria-prima e (e) reportando-se à curva padrão e às equações da reta encontradas em seu experimento, visando atender o nível citado acima, sugere como valor relativo máximo 1,90 para o primeiro componente e 1,30 para o segundo; os componentes provenientes da lise de proteínas são muito levemente afetados no processo UAT;

Em 1986, Vreeman et al., trabalhando com fracionamento da κ -caseína a pH 8,0 em DEAE-Sephafore com gradiente de NaCl, seguido de cromatografia de permeação em gel de alta eficiência (HPGPC), usando um gradiente decrescente

de pH 6,0 a 4,5, identificou, no mínimo, 10 componentes que poderiam ser identificados pela diferença do teor de ácido siálico e/ou teor de fósforo.

Segundo Fox (1989), a CLAE tem sido aplicada por diversos autores para o estudo do fracionamento de peptídeos em queijo e tem-se mostrado eficiente e com resultados bastante promissores.

Vilder et al. (1988) também usaram a técnica de CLAE para determinar soro, obtido por coagulação pela renina, em creme e leite ácido. Recio et al. (1996) estudaram as alterações da proteína em leite UAT utilizando a eletroforese capilar e comparando os resultados obtidos com a metodologia clássica do CLAE e os mesmos autores (2000) afirmaram que a presença de CMP em leite UAT não pode ser considerada indicação exclusiva de adulteração com soro.

3. ESTOCAGEM REFRIGERADA DE LEITE CRU

Há alguns anos vem se adotando, no Brasil, com tendência à generalização, a coleta granelizada do leite cru resfriado, diretamente nas fazendas, em carros-tanque, seja logo após a ordenha ou dentro de 24-72 horas. Esse procedimento cria condições seletivas para o crescimento de bactérias psicrófilas, particularmente, *Pseudomonas spp*, as quais podem rapidamente dominar a microflora e apresentar considerável poder deteriorativo (Neil, 1974, apud ROWE et al., 2001).

Algumas pseudomonas, apesar de não inerentemente termorresistentes, tem uma capacidade genética para elaborar proteinases e lipases termoestáveis, as quais atacam os componentes protéicos e lipídicos, respectivamente. Essas enzimas podem sobreviver à pasteurização e mesmo, em alguns casos, ao tratamento UAT, causando uma redução do rendimento de queijos, geleificação em leite UAT e *off-flavour* em alguns produtos lácteos. Quando presentes em meio apropriado ao seu para crescimento, as bactérias tendem preferentemente a catabolizar açúcares, mas a *Pseudomonas fluorescens* não possui essa capacidade genética para catabolizar a lactose, principal açúcar do leite. Assim,

seria razoável supor que essas bactérias utilizariam fontes de carbono e energia alternativas, como as proteínas e lipídeos e, portanto, haveria uma ligação causal entre a atividade hidrolítica e a habilidade da pseudomona em dominar (ROWE et al., 2001).

Considerando a estocagem do leite à uma temperatura de 4-6°C por 48 horas, o desenvolvimento de microrganismos psicrótrópicos em temperaturas baixas e que estes são os responsáveis pela formação de enzimas termorresistentes, Mottar (1984) avaliou como a matéria-prima estocada nessas condições influenciou sobre a conservação do leite UAT, concluindo que: (1) em relação ao leite cru de boa qualidade (menos de 10^4 ufc/ml e 2×10^3 de psicrótrópicos) a atividade proteolítica observada, mais no leite cru do que no leite UAT correspondente, foi atribuída à ação do sistema proteolítico do leite; (2) numa matéria-prima de boa qualidade, estocada sob refrigeração por mais de 72 horas, observou-se um aumento da atividade residual no leite UAT correspondente. Para leites de pior qualidade (com mais de 10^5 ufc/ml), um aumento de atividade análoga foi observado após estocagem por 48 horas, podendo ser comprovado pelo desenvolvimento notável da flora psicrótrófica e (3) o aumento do teor de ácido siálico, observado conjuntamente com o desenvolvimento de microrganismos psicrótrópicos proteolíticos levaram a supor que as proteases bacteriana e termoestáveis degradam uma grande quantidade da fração κ -caseína e que o mesmo não seria resultado da ação das proteases naturais do leite.

Na fabricação de leite UAT, quando se parte de um leite de boa qualidade ($<10^4$ ufc/ml logo após a ordenha), este leite pode, geralmente, ser estocado sob refrigeração durante 72 horas. Se a matéria-prima contém, inicialmente, mais que 10^4 ufc/ml, a duração normal de estocagem a 4-6°C é, em média, de 48 h. Uma estocagem de mais longa duração incorre no risco de concentração de proteases bacterianas termorresistentes suficientemente elevada para limitar significativamente a conservação do leite UAT (MOTTAR, 1984).

Dousset et al. (1988) trabalharam com leite de mistura refrigerado a 3°C e 8°C e que após 48 horas foi submetido a tratamento UAT indireto a 140°C por 4

segundos e, então, estocado a 30°C e 55°C, para determinar a sua atividade proteolítica. Após 2 dias de refrigeração a 3°C, a flora psicotrófica e a atividade proteolítica do leite cru é bastante fraca. O leite UAT, produzido a partir deste lote, conservou-se bem. Após 2 dias a 8°C, o mesmo leite apresentou uma flora psicotrófica e uma atividade proteolítica bastante elevada (10^4 ufc/ml e $0,57\Delta\mu$ moles de glicina/ml). Após 100 dias de conservação a 30°C, os pacotes de leite UAT apresentaram um ligeiro gosto amargo e uma atividade proteolítica ligeiramente superior a $0,1\Delta\mu$ moles de glicina/ml. Concluíram que o leite de mistura de várias ordenhas realizadas durante um período de 48 horas, de boa qualidade bacteriológica inicial, pode ser conservado por mais 48 horas, desde que em boas condições de refrigeração, sem conduzir a um desenvolvimento microbiano muito importante e a um aumento significativo de sua atividade proteolítica. Quanto à atividade proteolítica do leite, após tratamento UAT, os resultados confirmaram o trabalho de outros autores, que as proteases são destruídas em parte pelo aquecimento à ultra-alta temperatura, mas que persiste uma atividade residual avaliada em torno de 10% da atividade inicial.

Muir & Phillips (1984), estudando a relação entre contagem psicotrófica e lipólise em leite cru, demonstraram que a 6°C, a lipólise não se torna aparente até que a contagem psicotrófica exceda $5,0 \times 10^6$ ufc/ml. O resultado de análises de 64 amostras de leites de fazenda e 90 amostras de leite de laticínios estocadas a 4, 6 e 8°C demonstrou ser perigosa a extrapolação de valor médio, para todas as temperaturas de estocagem, pois a distribuição do tempo de geração das bactérias é muito ampla. Há uma diferença significativa entre o leite coletado na fazenda e o leite coletado no laticínio. Esta diferença é certamente uma consequência das diferentes idades do leite. Nas amostras da fazenda, a maioria das bactérias estava ainda na fase de latência, enquanto que nas amostras do laticínio, provavelmente, estavam no crescimento logarítmico. Para um tempo de geração aparente de 5,55 horas, a taxa de crescimento é relevante se a amostra com uma contagem inicial de $2,0 \times 10^5$ ufc/ml alcançar o valor limite de $5,0 \times 10^6$ ufc/ml em 24 h. A probabilidade desta taxa de crescimento ocorrendo a 4, 6 e 8°C

representa 3, 4 e 15% do total da população, respectivamente. Apesar disto, vários pontos surgem do cálculo da probabilidade de se ter uma estocagem segura de leite cru resfriado: primeiro, pequenas diferenças na temperatura de estocagem são muito importantes e segundo, se é necessário estender a estocagem do leite cru, então a contagem inicial de psicotróficos deve ser bem baixa, por exemplo, para uma estocagem segura por 72 horas, a contagem inicial não deve exceder 2.000ufc/ml.

Em 1996, Prata et al., estudaram a influência da coleta a granel sobre a qualidade do leite cru tipo B ($< 5,0 \times 10^5$ ufc/ml), mantido sob refrigeração na fazenda. As alterações de qualidade foram pesquisadas através de uma série de análises físico-químicas (temperatura, acidez, densidade, gordura, extratos secos total e desengordurado, crioscopia, teor de cloretos e ácido siálico livre) e microbiológicas (pesquisa de inibidores, redutase, contagem de mesófilos e contagem de psicotróficos) para os dois sistemas de coletas, 24 horas em latão e 48 horas a granel. Baseados nos resultados obtidos verificaram que não ocorria alteração significativa na qualidade do leite tipo B em função da ampliação do período de estocagem para 48 horas e da mudança no sistema de coleta, para os parâmetros avaliados.

4. AÇÃO DO CONGELAMENTO SOBRE O LEITE

O serviço de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, seja federal ou estadual, tem como procedimento usual a coleta e remessa de amostras de leite congeladas, logo após a colheita, para a pesquisa de soro, pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência. O congelamento das amostras faz-se necessário para impedir a ocorrência de uma possível proteólise e, dessa maneira, levar a um resultado duvidoso ou até mesmo falso-positivo, além de permitir sua conservação por períodos variáveis, até a execução de suas análises, principalmente, em se tratando das dimensões continentais do país.

O ponto de congelamento do leite costuma variar ligeiramente conforme a região onde o mesmo é produzido, havendo também uma pequena variação conforme a estação do ano, raça do gado, alimentação, tempo de lactação, vacinação, etc. O leite normal compõe-se de mais ou menos 87% de água e, aproximadamente, 13% de extrato seco total, sendo que, nestas condições, congelará a uma temperatura de $-0,550^{\circ}\text{H}$ ($-0,530^{\circ}\text{C}$) que poderá variar conforme o local e/ou a estação do ano, nunca sendo inferior a $-0,530^{\circ}\text{H}$ ($-0,512^{\circ}\text{C}$) e superior a $-0,560^{\circ}\text{H}$ ($-0,541^{\circ}\text{C}$) (FOX & McSWEENEY, 1998).

O congelamento do leite pode causar alterações nas suas propriedades. A completa geleificação no descongelamento raramente ocorre, mas sua aparência não permanece homogênea e, algumas vezes, exibe sedimentação, floculação ou liberação de óleo (TULLOCH & CHENEY, 1984). Quando estocado congelado, o complexo fosfocaseinato de cálcio é afetado e, com o tempo, há perda da estabilidade, aparecendo um precipitado quando o leite é descongelado. Inicialmente, a floculação é reversível com aquecimento e agitação, posteriormente, com a continuação da estocagem, torna-se irreversível (KEENEY & KROGER, 1974).

A caseína em leite concentrado (3x), integral ou desnatado, desestabiliza e forma um precipitado flocoso após várias semanas de estocagem a altas temperaturas de subcongelamento (-12 a -18°C). Vários pesquisadores encontraram que estocagem a temperaturas mais baixas reduz significativamente a taxa de desestabilização da proteína, entretanto, altas temperaturas de subcongelamento são invariavelmente encontradas no mercado varejista de produtos congelados (LONERGAN et al, 1981).

Num leite congelado abaixo de -20°C , a própria temperatura e a atividade de água são suficientemente baixas para prevenir a alteração microbiana e enzimática. A maioria das reações químicas tem lugar a velocidades desprezíveis, porém é possível a autooxidação dos lipídeos. A insolubilização da proteína constitui um problema na agregação das micelas de caseína e aparece depois de descongelado o produto; a congelação por si mesma não é a responsável e o

mais provável é que precipite a caseína (*salted out*); a agregação geralmente é reversível, se bem que a dispersão tem lugar lentamente. Talvez os responsáveis sejam o baixo pH, a alta força iônica, a intensa atividade do Ca^{2+} e o fraco poder solvente do líquido que permanece sem congelar (WALSTRA & JENNESS, 1984).

Muitas variáveis composicionais e de processamento afetam a estabilidade da micela de caseína em leite concentrado congelado. Estes fatores incluem a fração caseína, o pH, a composição mineral, o teor de sólidos totais, o teor de gordura, a homogeneização, temperaturas de pré-aquecimento ou pasteurização excedendo 77°C , o grau de concentração, resfriamento e/ou manutenção do produto sob refrigeração entre a concentração e o congelamento, a velocidade de congelamento, a cristalização da lactose, temperaturas de estocagem, principalmente abaixo de $-23,3^{\circ}\text{C}$ e acima de $-17,8^{\circ}\text{C}$, a flutuação dessa temperatura e a dilatação do período de estocagem (KEENEY e KROGER, 1974; MORR, 1975; WONG, 1988; KOSCHAK et al, 1981).

O pré-aquecimento do leite, até o grau em que as proteínas do soro se desnaturem, determina uma baixa estabilidade, provavelmente porque as proteínas do soro tornam-se muito mais sensíveis aos íons Ca^{2+} e participam na agregação (WALSTRA & JENNESS, 1984).

A homogeneização do leite aumenta a quantidade de caseína adsorvida na superfície do glóbulo de gordura. Durante o congelamento do leite homogeneizado há uma tendência, por parte de todos os sólidos do leite, incluindo os solúveis, de dirigir-se para o gelo e o sedimento. Estando o leite congelado, nenhum movimento de sólidos ocorre. Quando o produto é descongelado, novamente o efeito de sedimentação torna-se evidente e um líquido, com o aspecto de soro, aparece no topo da embalagem. Se o leite homogeneizado congelado, exibindo uma camada aquosa, após o descongelamento é agitado, adquire sua dispersão normal e não ocorre separação subsequente. Tal leite não é distinguível de um não congelado, a menos que alguma bateção ou destruição da emulsão de gordura tenha ocorrido (KEENEY & KROGER, 1974).

Os resultados obtidos por Koschak et al. (1981) indicaram que leite e leite concentrado congelados deveriam receber exposição limitada à temperatura abaixo de -20°C se o máximo de estabilidade protéica for desejado. Seguindo esse conceito conduziram seus estudos para estocagens a $-8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Tem sido documentado que temperatura abaixo de -9°C resulta em melhoria da estabilidade protéica. Leite congelado e estocado em temperatura abaixo de -20°C permanece estável por longo tempo, sendo que essa estabilidade diminui acentuadamente em temperatura acima de -20°C . Entretanto, os detalhes de como a estabilidade das proteínas do leite e do leite concentrado variam na faixa de 0 a -20°C são pouco conhecidos (KOSCHAK, et al., 1981).

A estabilidade da proteína melhora com os procedimentos de resfriamento e congelamento rápidos. A desestabilização, associada ao resfriamento e congelamento lentos, pode ser causada pela formação de grandes cristais de gelo, cristalização da lactose e desnaturação da proteína pelo frio. A estocagem de leite concentrado congelado rapidamente (15 minutos) pode ser estendida para 24 semanas (JOHNSON, 1971). Entretanto, Koschak et al. (1981), trabalhando com amostras de leite integral, normal e concentrado (3X), pré-aquecidas e congeladas rápida ou lentamente a -20 ou -78°C e, então, estocadas por períodos maiores que 4 semanas a -8°C , observaram que para o grau de concentração estudado, independente da temperatura máxima, o congelamento lento resultou em maior estabilidade protéica do que o congelamento rápido. Para todas as amostras congeladas lentamente a estocagem foi, aproximadamente, o dobro daquelas congeladas rapidamente.

O congelamento e estocagem do leite a -10°C causam cristalização da água pura, enquanto que o líquido não congelado torna-se mais saturado em relação aos vários sais. A força iônica da fase líquida aumenta com um concomitante aumento na concentração de Ca^{2+} , pois parte do fosfato de cálcio solúvel precipita-se como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, liberando H^+ e diminuindo o pH até 5,8 aproximadamente. A cristalização da lactose como α -monohidratada exacerba a situação. A combinação do aumento da concentração de Ca^{2+} e a redução do pH

causam desestabilização das micelas que precipitam quando o leite é descongelado (FOX & McSWEENEY, 1998).

A estabilidade física do sistema micelar da caseína está fortemente relacionada com o grau de cristalização da lactose da fase não congelada. Essa cristalização aumenta temporariamente o ponto de congelamento da solução, levando a um aumento da concentração e promovendo a desestabilização da micela de caseína (WONG, 1988). Enquanto a lactose permanecer em estado amorfo, a caseína geralmente mantém sua estabilidade, porém a cristalização da lactose desencadeia sua rápida agregação. Por isso, é importante congelar rapidamente e manter a temperatura abaixo de -20°C (WALSTRA & JENNESS, 1984).

O teor de sais no leite é maior do que pode ser mantido em solução, isto é, o excesso desses sais não está em solução verdadeira, mas em estado coloidal, mantendo-se em equilíbrio com os sais dissolvidos. Tratamentos, como a estocagem congelada e o aquecimento, causam uma mudança do equilíbrio salino do leite, sugerindo que a interação entre o fosfato tricálcico precipitado e as micelas de caseína deva ser a responsável pela instabilidade (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

Usando ultrafiltração, Wells & Leeder (1963) mostraram que a desestabilização da caseína, durante a estocagem congelada, foi acompanhada pela perda de cálcio solúvel, fosfato e citrato. A união cálcio-fosfato formada durante o congelamento é diferente, nesse caso, daquela apresentada na micela de caseína nativa de um leite estável (CHEN & YAMAUCHI, 1971).

A insolubilização do cálcio total e iônico ultrafiltrável, fosfato inorgânico e citrato durante o congelamento do leite foi evidenciada no estudo de Chen & Yamauchi (1969). Entretanto, é difícil correlacionar esses constituintes do ponto de vista de suas tendências na insolubilização e reversão. Cálcio ultrafiltrado começa a se insolubilizar no início do período de estocagem (até os 15 dias), mas a insolubilização do fosfato inorgânico é branda neste período. As características de reversão do cálcio e fosfato inorgânico são também diferentes.

A desestabilização da caseína durante a estocagem congelada de leite ou leite concentrado tem sido estudada pelas suas implicações práticas bem como pela sua relação com a estrutura e a função da micela. A criodesestabilização da caseína parece envolver a aglomeração da micela de caseína por meio de ligações cruzadas do cálcio. A concentração de cálcio e fósforo no complexo caseinato aumentou com a estocagem congelada. El-Negoumi & Boyd apud Lonergan et al. (1982) encontraram, por diálise do leite contra simulação de leite ultrafiltrado, que a remoção do cálcio, mas não a do fósforo, melhora a estabilidade do leite durante subsequente estocagem congelada. A remoção do fósforo diminui levemente a estabilidade. Isto sugere que se a união por ligações cruzadas das micelas de caseína é a causa da desestabilização durante a estocagem congelada, então é o cálcio, em vez do fosfato tricálcico, que as forma. No entanto, os autores não excluíram a possibilidade de que o ponto de ligação do cálcio à micela pode ser por uma ligação do grupo fosfato. Se o cálcio é um reagente no processo de criodesestabilização, então com a sua remoção do leite seria de se esperar um aumento da estabilidade da caseína durante a subsequente estocagem congelada. A remoção de 10-15% do cálcio total do leite, substituído pelo sódio, melhora a estabilidade protéica na estocagem congelada (LONERGAN et al, 1982).

A estabilidade da micela de caseína em leite concentrado congelado é intensificada pela remoção dos íons cálcio ou pela adição do íon-complexador químico de cálcio, como o hexametáfosfato. Ambos os tratamentos dissipam a micela e formam caseína solúvel compondo-se em grande parte num agregado indefinível e submicelas (MORR, 1975). A adição de hidrocolóides, semelhantes aos estabilizadores do sorvete, bem como, a hidrólise enzimática da caseína inibem a cristalização da lactose, estabilizando, assim, as micelas em leite concentrado congelado (Webb, 1970 apud WONG, 1988).

Muitos aditivos como a sacarose ou agentes seqüestrantes e remoção parcial do cálcio ou hidrólise enzimática parcial da lactose tem melhorado a vida de estocagem, mas não com total sucesso (CHEN & YAMAUCHI, 1969). A adição

de açúcar (por exemplo: a sacarose) melhora, consideravelmente, a estabilidade ao diminuir a concentração salina, isto se deve a uma dada atividade de água - a_w (determinada pela temperatura); mais açúcar implica em mais água (menos gelo), portanto uma relação sal-água menor; pela mesma razão a hidrólise da lactose, antes do congelamento, melhora a estabilidade da proteína, aumenta a concentração molar de açúcar e previne ou ao menos diminui a sua cristalização. A estabilidade do leite concentrado congelado é, portanto, muito menor (WALSTRA & JENNESS, 1984).

Koschak et al. (1981) usaram dois procedimentos para descongelamento e avaliação da estabilidade protéica. Primeiramente, amostras de leite congelado foram descongeladas lentamente por 3 horas num banho-maria a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Antes da medida de viscosidade, as amostras foram suavemente homogeneizadas por 45 vezes. No segundo, amostras foram descongeladas por 24 horas a 4°C e agitadas lentamente por 5 minutos em agitador de velocidade variável equipado com uma pá fina (2 aletas medindo 1,5cm de altura por 40cm de largura cada) e operando a 100rpm. Quanto à viscosidade e índice de solubilidade, o leite integral normal (12% de sólidos totais) foi o menos estável a -8°C e o mais estável a 0, -2 e -20°C . Quando o índice de solubilidade excedia 1,0 ml/50 ml de leite indicava instabilidade, ficando evidente que a temperatura de estocagem entre -4 e -12°C era especialmente indesejável. Quanto à aparência visual, amostras a -8°C tornaram-se inaceitáveis em 2 semanas, ao passo que amostras a 0 e -20°C mantiveram-se com aparência aceitável durante 12 semanas de estocagem.

Tulloch & Cheney (1984) congelaram amostras de leite a -10 e -18°C , armazenando-as por dois meses. Após esse período, foram descongeladas em refrigerador entre 2 e 4°C e julgadas quanto aos caracteres organolépticos: aparência, *flavour* e precipitação de proteína. A extensão da floculação ou precipitação da proteína foi determinada pelo derramamento do leite para um béquer de vidro, observando-se a aderência de algum material nas suas laterais. De 63 amostras congeladas a -10°C , 7 e 11 apresentaram, respectivamente,

ligeira e excessiva precipitação. Das 61 amostras congeladas a -18°C , 14 apresentaram ligeira precipitação e somente 2 tiveram excesso de floculação.

Chen & Yamauchi (1969) trabalharam com leite desnatado pasteurizado (63°C por 30 minutos), resfriado entre $20-25^{\circ}\text{C}$, deixado de um dia para outro em câmara fria a 5°C e, então, estocado a -7°C , por diferentes períodos, variando de 15 a 180 dias. Amostras foram colhidas a intervalos e descongeladas em banho-maria a 37°C . Cerca de meia à uma hora foi necessário para descongelar a amostra. Durante o descongelamento teve-se o cuidado de agitar suavemente para que a temperatura do conteúdo não atingisse 10°C . As amostras descongeladas foram armazenadas em câmara fria (5°C) por 30 minutos para estabilizar a temperatura e só então procedendo à primeira ultrafiltração. Foi observado que o teor de cálcio total ultrafiltrado mostrou uma queda maior nos primeiros quinze dias, continuou a diminuir até próximo dos 120 dias e manteve-se constante, com tendência a aumentar por volta dos 180 dias. O fosfato inorgânico ultrafiltrado não diminuiu até os 15 dias, porém diminuiu rapidamente até por volta dos 60 dias, mantendo-se constante até os 150 dias e diminuindo até os 180 dias.

O efeito da agitação sob o cálcio e fosfato ultrafiltrados, assim como na estabilidade da caseína, demonstraram que grande parte do cálcio total e fosfato inorgânico insolubilizados foi revertida para forma ultrafiltrada pela agitação no início da estocagem. A desestabilização da caseína no período inicial também foi revertida para forma estável. Posteriormente, especialmente entre 120 e 150 dias, o fosfato inorgânico ultrafiltrado insolubilizado reverteu firmemente durante a agitação. A instabilidade da caseína diminuiu com o progresso da estocagem congelada, sendo que nenhuma precipitação ocorreu após os 150 dias (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

A estocagem congelada a -7°C por 15 e 30 dias causou marcante aumento na viscosidade do leite desnatado, mas se aproximou do valor do leite não congelado quando se efetuou agitação por 48 horas no leite estocado à -7°C por 15 dias. Na estocagem por 30 dias também ocorreu uma reversão parcial na viscosidade pela agitação. Comparando os resultados da viscosidade com os da

estabilidade da caseína, uma tendência diferente pode ser apontada. A desestabilização da caseína por 15 ou 30 dias de estocagem reverteu-se quase completamente durante as primeiras 24 horas de agitação, enquanto que a reversão foi somente parcial para a viscosidade. No teste de estabilidade, apenas floculação grosseira foi separada (centrifugação), estimando-se que seja facilmente desagregada para partículas não sedimentáveis durante a agitação, mas ainda com grande tamanho quando comparadas às micelas de caseína nativas, contribuindo para o aumento da viscosidade (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

Parece que a interação do cálcio iônico com as micelas de caseína é a principal responsável pela formação do floculado redispersável no estágio inicial do congelamento. Talvez a estrutura da micela de caseína não seja drasticamente modificada e a interação do cálcio possa ser revertida pela agitação. A incorporação do fósforo inorgânico parece estar relacionada com a formação do precipitado caseico, que é redispersado por agitação (CHEN & YAMAUCHI, 1969). Fox et al. (1965) sugeriram que o fosfato poderia penetrar na micela de caseína e modificar sua estrutura, com formação de um complexo de precipitação grosseira. O prolongamento do tempo de estocagem, mais que 150 dias, causou um ligeiro aumento do cálcio iônico, citrato ultrafiltrado e caseína não sedimentável, indicando que certos componentes da caseína liberaram-se para formas solúveis. Isso sugere que possa haver uma degradação parcial do complexo caseinato desestabilizado, quando o congelamento é estendido (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

Ao analisar resultados de 24 amostras de leite, Tulloch & Cheney (1984) observaram que não houve relação aparente entre a contagem bacteriana do leite pasteurizado e avaliação organoléptica após congelamento e descongelamento. As contagens mais altas foram classificadas como boas em todos os caracteres organolépticos após estocagem a -18 e -10°C, enquanto alguns leites com contagens baixas apresentaram problemas. Somente duas das contagens padrão de placas excederam $5,0 \times 10^4$ ufc/ml, cuja média foi $1,8 \times 10^4$ ufc/ml e somente três (3) amostras tinham contagens de psicotróficos maiores que $2,0 \times 10^3$ ufc/ml.

Essas amostras quando resfriadas tinham uma contagem de placas de $7,3 \times 10^4$ e $7,4 \times 10^4$ ufc/ml e contagem de psicrotróficos de $4,0 \times 10^4$ e $4,8 \times 10^4$ ufc/ml, separadamente. Em outro experimento, demonstraram que 33 das 61 amostras de leite pasteurizado, congelado e armazenado por 2 meses, sob condições ideais a -18°C , apresentaram visíveis defeitos quando descongeladas. Quando estocadas a -10°C os problemas foram maiores em número e intensidade. O leite que quando pasteurizado tinha menor contagem bacteriana e contagem muito baixa de psicrotróficos, não apresentou aparente relação entre a qualidade bacteriológica após pasteurização e a ocorrência de defeitos. Para Koschak et al. (1981), a alta viscosidade que se desenvolveu em amostras estocadas por 12 semanas a 0°C poderia ter sido o resultado do crescimento bacteriano, uma vez que as contagens (total e de psicrotróficos) em amostras estocadas a 0 e -2°C foram notadamente maiores do que naquelas amostras estocadas a temperatura mais baixa, sugerindo ser improvável que o crescimento bacteriano tenha influenciado significativamente os resultados para temperatura abaixo de -2°C .

Koschak et al. (1981) observaram que a desestabilização da caseína, quando avaliada em amostras descongeladas de leite e leite concentrado, foi detectável precocemente pelas alterações da aparência visual mais do que as modificações na viscosidade ou índice de solubilidade. A estabilidade da proteína, da maioria das amostras, determinada pelo índice de solubilidade, viscosidade e aparência, tendeu a diminuir não linearmente quando a temperatura de estocagem ficou abaixo do ponto de congelamento, não melhorando até que temperatura abaixo de -12°C fosse utilizada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.5, p.823-827, May 1976.

BENGTSSON, K.; GARDHAGE, L.; ISAKSSON, B.; Gelations in UAT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistance proteases. **Milchwissenschaft**, v.28, n. 8, p.495-499, 1973.

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 da Secretaria de Defesa Agropecuária n. 22, 14 abr. 2003. **Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da União, 02 mai. 2003, p.3-25.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**: biquímica, propriedades funcionais, valor nutricional, modificaciones químicas. Zaragoza: Ed. Acribia, 1989, p.179-216.

CHEN, C.-mo; YAMAUCHI, K. Gel filtration of caseins micelles from milk destabilized by frozen storage. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.35, n.5, p.637-643, 1971.

CHEN, C-mo; YAMAUCHI, K. Change of salt distribution in milk during frozen storage and its partial reversion after thawing. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.33, n.9, p.1333-1341, 1969.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.; BONATO, P.B.; **Introdução a métodos cromatográficos**, 7.ed., Campinas: Ed. da Unicamp, 1997.

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

DOUSSET, X.; DEMAIMAY, C.; RAVAUD, C.; LEVESQUE, A.; PINET, X.; KERGO, Y.; Influence de la température de réfrigération du lait sur la protéolyse et l'ânerume du lait UAT au cours de son stockage. **Lait**, v.68, n.2, p.143-156, 1988.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1370-1400, 1989.

FOX, P. F. Chemistry of the caseins. In: **Advanced Dairy Chemistry – 1: Proteins**, 1. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1992. cap.2, p.63-110.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. cap. 4 e 5, p. 146-264.

FOX, K.K.; HARPER, M.K.; HOLSINGER, V.H.; PALLANSCH, M.J. Gelation of milk solids by orthophosphate. **Journal Dairy Science**, v.48, n.2, p.179-185, Feb. 1965.

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

FUKUDA, S.P.; RÖIG, S.M .; PRATA, L. F. Metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico no leite. **Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios**, p.114-120, Juiz de Fora / MG, 1994.

FUKUDA, S. P.; RÖIG, S. M .; PRATA, L. F. Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para detecção da adição de soro

ao leite. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SBCTA, v.16, n.1, p.52-56, 1996.

FURLANETTI, A.; PRATA, L.F.; Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SBCTA, no prelo

GARG, S. K. Psychrotrophs in milk – a review. **Indian Journal Dairy Science**, v.43, n. 3, p.433-440, 1990.

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite esterilizado “longa vida”**. Campinas, 1995, 112p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GUAMIS, B.; HUERTA, T.; GARAY, E. SDS-PAGE study of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw milk. **Milchwissenschaft**, v.42, n.2, p.89-91, 1987.

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

JOHNSON, C.E. Some factors affecting the storage stability of frozen milk concentrate. **Dissertation Abstracts International**, Section B., v.31, n.11, p.6677-6678, 1971.

KEENEY, P.G.; KROGER, M. Frozen dairy products. In: WEBB, B.H. et al. **Fundamentals of dairy chemistry**, 2.ed. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut., 1974. cap. 14, p.873-886.

KOSCHAK, M.S.; FENNEMA, O.; AMUNDSON, C.H.; LEE, J.Y. Protein stability of frozen milk as influenced by storage temperature and ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v.46, n.4, p.1211-1217, 1981.

LAW, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v.46, p.573-588, 1979.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Enzimas. In: **Princípios de Bioquímica**, 2.ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1995. cap. 8.

LÉONIL, J. ; MOLLÉ, D. A method for determination of macropeptide by cation-exchange fast protein liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. **Journal of Dairy Research**, v.58, n. 3, p.321- 328, 1991.

LONERGAN, D.A.; FENNEMA, O.; AMUDSON, C.H. Stability of proteins in ultrafiltered, low-lactose milk concentrate during frozen storage. **Journal of Food Science**, v.46, n.5, p.1603-1611, 1981.

LONERGAN, D.A.; FENNEMA, O.; AMUDSON, C.H. Use of electro dialysis to improve the protein stability of frozen skim milks and milk concentrates. **Journal of Food Science**, v.47, n.5, p.1429-1434, 1982.

MEHRENS, H.A.; REIMERDES, C.H.; Detection of whey in foods using the κ -caseinmacropeptide. **Git-Fachzeitschrift-fur-das-Laboratorium**, v.30, n.5, p.406-409, 1986.

MORR, C.V. Chemistry of milk proteins in food processing. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.7, p.977-984, Jul. 1975.

MOTTAR, J.; Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UHT. **Lait**, v.64, n. 635-636-637, p.29-45, 1984.

MOTTAR, J.; RENTERGHEM, R. van; VILDER, J. Evaluation of the raw material for UAT milk by determining the degree of protein breakdown through HPLC. **Milchwissenschaft**, v.40, n.12, p.717-721, 1985.

MUIR, D.D.; PHILLIPS, J.D.; Prediction of the shelf life of raw milk during refrigerated storage. **Milchwissenschaft**, v.39, n. 1, p.7-11, 1984.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and its fractions. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v.47, n.7, p.2613-2616, Jul. 1999.

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 Dairy Journal**, v.37, p.27-36, 1983.

PRATA, L.F.; FUKUDA, S.P.; MARTINS, L.S.; FIGUEIREDO, S. F. Influência da coleta a granel, em dias alternados, sobre a qualidade do leite cru mantido sob refrigeração na fazenda. **Higiene Alimentar**, v.10, n.45, p.29-34, 1996.

PRATA, L.F. **Distribuição de GMP livre, em leites crus e pasteurizados, na definição da detecção de fraudes por adição de soro**. Jaboticabal, 2002. 104p. Tese (Livre Docência em Inspeção de Alimentos de Origem Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

RECIO, I.; FRUTOS, M.; OLANO, A.; RAMOS, M. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-

performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.12, p.3955-3959, Dec. 1996.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO,R; Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v.67, n.4, p.625-630, 2000.

REINHEIMER, J.A.; DEMKOW, M.R.; CALABRESE, L.A. Characteristics of psychrotrophic microflora of bulk-collected raw milk from the Santa Fe area (Argentina). **Australian Journal of Dairy Technology**, v.45, p.41-46, Nov., 1990.

ROWE, M.T.; DUNSTALL, G.; KILPATRICK, D.; WISDOM, G.B. A study of changes in the psychrotrophic microflora of raw milk during refrigerated storage. **Milchwissenschaft**, v.56, n.5, p.247-250, 2001.

SAITO, T.; ITOH, T. Variations and distributions of O-glycosidally linked sugar chains in bovine κ -casein. **Journal Dairy Science**, v.75, p.1768-1774, 1992.

SHAMMET, K.M.; BROWN, R.J. ; MAHON, D.J.Mc. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on κ -casein. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1373-70, 1992.

TULLOCH, D.; CHENEY, M. Keeping quality of Western Australian frozen milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.39, n.2, p.85, 1984.

UCKO, D. A . Enzimas. In: **Química para as ciências da saúde. Uma introdução à química geral, orgânica e biológica**, 1. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 15.

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

VILDER, J.; RENTERGHEM, R. van; WAES, G. Determination of rennet whey in sour cream and buttermilk. **Milchwissenschaft**, v.43, n.7, p.426-429, 1988.

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

WALSTRA, P.; JENNESS, R. Propriedades de los concentratos lácteos – Congelación. In: **Química y física lactológica**. 1.ed., Ed. Acribia: Zaragoza. Espanha, 1984. cap. 17. p. 269-300.

WELLS, P.R.; LEEDER, J.G. Changes related to casein precipitation in frozen concentrated milk. **Journal of Dairy Science**, v.46, p.789-798, 1963.

WHITAKER, J.R. Introdução. In: **Principles of enzymology for the food sciences**, 2^o ed., New York: Marcel Dekker, Inc. , 1994. cap. 1.

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; PINTO, A.P.E.F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.5, n.2, p.111-115, 1985.

WONG, N.P.; Chemistry of Processing. In: **Fundamentals of dairy chemistry**, 3.ed. Van Nostrand Reinhold, N.Y., 1988. cap.14, p.739-766.

YAMAMOTO, A. Proteolytic enzymes. In: NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in food processing**. 2..ed. San Diego: Academic Press, INC., 1975, p.123-175.

YAO, K.; UBUKA, T.; MASUOKA, N.; KINUTA, M.; IKEDA, T. Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. **Analytical Biochemistry**, v.179, p.332-335, 1989.

ZALAZAR, C.A.; MEINARDI, C.A.; CANDIOTI, M.C. Caseificazione di latte termizzato e refrigerato. **Science Tecn. Lattiero-Casearia**, v.41, p.495-509, 1990.

ZALAZAR, C.A.; MEINARDI, C.A.; PALMA, S.; SUAREZ, V.B.; REINHEIMER, J.A. Increase in soluble sialic acid during bacterial growth in milk . **Australian Journal of Dairy Technology**, v.48, p.1-4, may, 1993.

Parte deste capítulo foi encaminhado para publicação no **Boletim SBCTA**, com o título “Atividade proteolítica de psicrotóxicos no leite cru e métodos de monitoração do caseinomacropéptido/glicomacropéptido utilizados no Brasil – Revisão”. (Recebido pela revista em 12/09/03)

CAPÍTULO I I

CORRELAÇÃO DA METODOLOGIA DA NINIDRINA ÁCIDA COM A CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE PARA AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO AO LEITE

CORRELAÇÃO DA METODOLOGIA DA NINIDRINA ÁCIDA COM A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE PARA AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE SORO AO LEITE

RESUMO

O método da ninidrina ácida utilizando a espectrofotometria na região visível do espectro, a 470nm, para a determinação quantitativa de ácido siálico livre ou ligado à glicoproteína κ -caseína na pesquisa de fraude de adição de soro de queijo ao leite fluido, além de ser de fácil execução, tem se mostrado eficiente na rotina laboratorial. Neste trabalho, o mesmo foi comparado com a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, internacionalmente aceita para a quantificação do caseinomacropéptido – CMP, devido à sua precisão na detecção da presença fraudulenta de soro no leite, a qual requer equipamento sofisticado e mão de obra especializada. Em diversas circunstâncias amostrais (leite cru e leite adicionado intencionalmente com soro em diferentes proporções), os métodos se correlacionaram, apresentando, para um intervalo de confiança de 95%, um valor de r igual a 0,981, quando no método de ninidrina ácida se utilizou a desproteinização do leite com ácido tricloroacético - TCA na concentração final de 12%. Quando se alterou a concentração final de TCA para 10% e 8%, foram obtidos valores de r iguais a 0,992 e 0,993, respectivamente.

Palavras-chave: Leite. Fraude. Adição de soro. Ninidrina. CLAE.

SUMMARY

The acidic ninhydrin spectrophotometric method for quantitative determination of free and bounded sialic acid of milk glycoprotein has been proved to be fast and efficient for routine detection of fraudulent addition of whey to fluid milk. On this research it was compared with HPLC method (High Performance Liquid Chromatography), internationally recommended for CMP (casein

macropeptide) determination, that besides its high accuracy is more sophisticated and requires trained personal. For several samples conditions (raw milk and milk added with variables amounts of sweet cheese whey), the methods showed an excellent linear correlation, with $r = 0,981$ when milk was desproteinized with 12% TCA solution. With final concentrations of 10% and 8% could be seen best correlation's, respectively, $r = 0,992$ and $0,993$.

Key-words: Milk. Adulteration. Whey addition. Ninhydrin. HPLC.

1. INTRODUÇÃO

A principal proteína do leite, a caseína, está presente na forma de micelas, que são complexos esféricos contendo 92% de proteína e 8% de sais inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio (FOX, 1992).

As caseínas são muito suscetíveis à proteólise porque contêm estruturas ao acaso, de pouca organização espacial, representadas por pequena quantidade de estruturas secundárias do tipo helicoidal (CROMIE, 1992). As micelas possuem uma estrutura porosa devido à sua composição em submicelas, sendo que estas estão ligadas ao fosfocaseinato de cálcio. O modelo aceito atualmente é aquele em que o teor da κ -caseína nas submicelas varia e que as deficientes em κ -caseína estão localizadas no interior das micelas enquanto as ricas em κ -caseína estão concentradas na superfície, dando às micelas uma camada rica em κ -caseína com alguma α_{s1} , α_{s2} e β -caseínas também expostas na superfície. Esse modelo sugere que a região hidrofílica C-terminal da κ -caseína projeta-se para a superfície, dando às micelas uma aparência “pilosa”. Esta “camada pilosa” é responsável pela estabilidade da micela e, se for removida, a sua estabilidade coloidal é destruída e ela coagula ou precipita (FOX & McSWEENEY, 1998).

A κ -caseína, com peso molecular mínimo de 19.000Da e 169 resíduos de aminoácidos (CHEFTEL et al., 1989), é uma fosfoproteína contendo aproximadamente 6-10% de carboidratos, consistindo de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico ou NANA), galactose e N-acetilgalactosamina (FOX & McSWEENEY, 1998). É a fração das caseínas insensível ao cálcio e, em condições normais, desempenha um papel importante na estabilidade da micela, impedindo a precipitação da α_s e β -caseína, em presença daquele íon (SHAMMET et al., 1992). Essa propriedade estabilizadora é perdida durante a coagulação enzimática pela renina. Somente a κ -caseína é hidrolisada durante a fase primária da ação da renina ou quimosina (EC 3.4.23.4), especificamente no sítio de clivagem entre os aminoácidos Phe₁₀₅ – Met₁₀₆. Esta ligação é muitas vezes mais suscetível à hidrólise

por proteinases ácidas (as reninas comerciais são proteinases ácidas) do que por aquelas do sistema protéico do leite (FOX, 1989).

Na clivagem inicial por ação da renina há, portanto, a formação de dois peptídeos, sendo um deles composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105, designado de para- κ -caseína e o outro do resíduo 106 a 169, que, por carrear todos os açúcares da κ -caseína, é conhecido como glicomacropéptido (GMP), sendo que um desses açúcares é o ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico. A κ -caseína é heterogênea, apresentando 2 variantes genéticas A e B, podendo o teor de carboidratos na molécula variar de 0 a 15% e, como há a possibilidade de se obter fragmentos com ausência glucídica, o peptídeo terminal pode ser chamado de macropéptido ou caseinomacropéptido (CMP) que permanece solúvel no soro e é separado da coalhada durante a fabricação de queijos (GUINEE & WILKINSON, 1992; SHAMMET et al., 1992).

Geralmente, as proteinases bacterianas também atacam, preferencialmente, a κ -caseína produzindo a para- κ -caseína. Isso acarreta a desestabilização da micela de caseína e uma hidrólise acentuada provoca a coagulação do leite. O ataque preferencial à κ -caseína é esperado, pois essa fração está localizada na superfície da micela e acessível à degradação inicial. As α e β -caseínas são também atacadas, sendo a β -caseína mais suscetível que a α -caseína. As caseínas são subseqüentemente degradadas em polipeptídeos de pequeno peso molecular e aminoácidos. Algumas proteinases bacterianas atacam as caseínas em ordens de preferência diferentes da acima citada, porém as proteínas do soro, normalmente, não são degradadas (CROMIE, 1992).

Um dos métodos para monitorar a ação coagulante baseia-se na determinação do ácido siálico, um indicador específico da liberação do GMP (LÉONIL & MOLLÉ, 1991).

Van Hooydonk & Olieman (1982) descreveram como rápido e sensível, o método de cromatografia líquida de alta eficiência para acompanhar a ação da quimosina em leite. Em 1983, Olieman & Beden, utilizaram esse método para

detectar e estimar em leite em pó desnatado a presença de sólidos de soro de leite obtidos pela ação da renina.

As variações na composição da fração glicosilada são responsáveis por variações na solubilidade do CMP em ácido tricloroacético - TCA. O macropeptídeo solúvel em 2% de TCA refere-se ao CMP que inclui as formas glicosiladas e, eventualmente, também as não glicosiladas se presentes, enquanto que o macropeptídeo solúvel em 12% de TCA refere-se aos que contém o carboidrato total da κ -caseína, o GMP (LIESKE & KONRAD, 1996).

A avaliação do CMP liberado seja por HPLC ou cromatografia líquida rápida (FPLC) depende do afastamento de outras proteínas usando TCA (LIESKE & KONRAD, 1996).

Para van Hooydonk & Olieman (1982), a concentração final ótima, para evitar interferentes na determinação de GMP por cromatografia, é a de 8% de TCA, na qual as proteínas do soro de queijo estão virtualmente ausentes. Baixas concentrações de TCA resultam em remoção insuficiente das proteínas do soro, enquanto que as altas causam precipitação de quantidades maiores de GMP.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Portaria n. 124 de 23/09/91 (BRASIL, 1991), aprovou dois métodos analíticos de detecção de soro em leite, um quantitativo para a determinação de GMP através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, e outro qualitativo, baseado na pesquisa de ácido siálico, metodologia esta adaptada por Wolfschoon-Pombo & Pinto (1985) utilizando o reativo de Ehrlich.

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, utilizando como cromóforo a ninidrina ácida (Reagente 2 de Gaitonde).

Nesse mesmo ano, Fukuda et al., propuseram a padronização do método da ninidrina ácida para a determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico (NANA) livre ou ligado à glicoproteína de leite fluido e soro, na região do visível do espectro, a 470nm. O método mostrou-se

exato, preciso e sensível a pequenas variações, ao redor de 2%. Aliado a essas características, o método mostrou-se de fácil execução, com grande possibilidade de aplicação rotineira, por não envolver materiais e equipamentos sofisticados ou mão de obra qualificada, além de reduzir o tempo de execução quando comparado com outras metodologias, por dispensar a hidrólise a quente.

A determinação de GMP pela técnica da ninidrina ácida padronizada por Fukuda et al. (1994) para a obtenção do filtrado TCA utilizou a concentração final de 12%, com o objetivo de trabalhar unicamente com as formas glicosiladas e livre de possíveis interferentes. Já a técnica de CLAE utiliza para a obtenção dos mesmos filtrados das amostras, a concentração de 8% de TCA, buscando trabalhar com todas as formas de CMP (Van HOOYDONK & OLIEMAN, 1982).

Pelos resultados obtidos, Fukuda et al. (1996) propuseram a utilização do método da ninidrina ácida como um teste de “screening” para a classificação do leite recebido pelas indústrias de laticínios quanto à possível fraude por adição de soro, classificando-o como negativo (absorbância a 470nm $\leq 0,300$ ou $\leq 5,14\mu\text{g}$ Nana livre/ml de leite), suspeito (absorbância a 470nm entre 0,300 e 0,600 ou entre 5,14 a 10,64 μg Nana livre/ml de leite) ou positivo (absorbância a 470nm $> 0,600$ ou $> 10,64\mu\text{g}$ Nana livre/ml de leite).

Recentemente, Furlanetti & Prata estudaram as variações dos teores de GMP livre e total (após coagulação da amostra com renina comercial) no leite bovino durante a lactação, utilizando o método da ninidrina ácida padronizado por Fukuda et al. (1994) e concluíram que as formas de GMP livre e total variam de acordo com o período da lactação, as condições sanitárias do úbere e é inversamente proporcional à produção do leite. O GMP livre tem teor mais alto quando próximo do período colostrar e durante o final da lactação, enquanto o GMP liberado pela renina mostra um comportamento similar, porém seu teor é dez vezes maior que o GMP livre.

Prata (2002), trabalhando um universo amostral maior, ratificou o método da ninidrina ácida como sendo eficiente na detecção de fraudes por adição de soro, porém sugeriu alterações dos valores propostos por Fukuda et al. (1996), ou seja,

para categoria dos negativos: de $A_{470\text{nm}} \leq 0,300$ ou $\leq 5,14\text{mg Nana/litro de leite}$; categoria dos suspeitos: $0,300 < A_{470\text{nm}} < 0,450$ ou de $5,15$ a $7,89\text{mg Nana/litro de leite}$ e para a categoria dos positivos: $A_{470\text{nm}} \geq 0,451$ ou $> 7,89\text{mg Nana/litro de leite}$.

Em abril de 2003, a técnica da ninidrina ácida para a determinação quantitativa de ácido siálico foi homologada como método oficial constante no Manual de Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos do Ministério da Agricultura, publicado através da Instrução Normativa nº 22 de 14/04/03 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a correlação existente entre o método da ninidrina ácida com o da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, em várias circunstâncias amostrais de leite cru e leite adicionado intencionalmente de soro em diferentes proporções, e a influência nos resultados do uso das concentrações de 8%, 10% e 12% de TCA.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite cru de origens conhecidas foram colhidas durante o período de 2 meses na época de safra nas plataformas de recepção de laticínios da região de Barretos/SP, representando uma mistura de vários produtores. O Soro de leite proveniente da fabricação de queijos das indústrias da mesma região, foi aquecido à temperatura de 80°C por 15 minutos em banho-maria, para inativação enzimática e, em seguida, resfriado em banho de gelo. Todas as amostras de leite e de soro foram armazenadas em caixas térmicas com gelo até a entrada no laboratório. O soro, quando não utilizado no dia de sua produção, foi congelado.

As diversas amostras de leite sofreram a adição variada de 2,5% a 60% de soro de leite para a correlação entre as técnicas de ninidrina ácida e CLAE. Estas amostras foram congeladas em freezer doméstico (-14°C), até serem submetidas a cromatografia. As determinações, por qualquer das metodologias citadas, tanto

para as amostras de leite ou de leite adicionado de soro, foram realizadas em duplicatas.

Para a obtenção de pontos eqüidistantes que permitissem comparações em amplo intervalo de variações, tornou-se necessária a adição de diferentes quantidades de soro doce de queijos às amostras de leite, com conteúdo de GMP previamente conhecido, determinado pela técnica de ninidrina ácida. Foram delineados 6 (seis) experimentos em duplicatas, com adições controladas de soro, variando de 2,5% a 60%, conforme mostra Tabela 1.

Todas as amostras foram submetidas ao teste da ninidrina ácida nas concentrações de 8%, 10% e 12% de TCA e de CLAE na concentração de 8% de TCA.

Tabela 1. Delineamento experimental realizado em amostras de leite cru sem e com a adição de soro de leite em quantidades variáveis e submetidas aos testes de ninidrina ácida e CLAE.

Adição de soro ao leite (%)	E X P E R I M E N T O S					
	I	II	III	IV	V	VI
0,0	X	X	X	X	X	X
2,5	X	X				
5,0	X	X	X	X		
7,5					X	X
10,0	X	X	X	X		
15,0					X	X
20,0	X	X	X	X		
30,0					X	X
40,0			X	X		
60,0					X	X

Os resultados obtidos foram avaliados por regressão linear, para se obter a equação da reta e os valores do coeficiente de correlação (r) e de determinação (r^2).

2.1. METODOLOGIA ANALÍTICA:

2.1.1. Método da Ninidrina Ácida:

A cada 10 ml de leite acrescentou-se, sob agitação, 10ml de ácido tricloroacético – TCA a 24% (m/v). Após homogeneização e repouso por 30 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro (Whatman nº. 40). Tomou-se 10ml do filtrado desproteinizado, colocou-os em tubos de centrífuga (não cônicos) e adicionou-se 1ml de ácido fosfotúngstico a 20% (m/v). Seguiu-se centrifugação a 3.500rpm por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e dispersou-se o sedimento com 6ml de álcool etílico 95% (v/v). Procedeu-se à nova centrifugação por 10 minutos. Desprezou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se, ao resíduo, 2ml de ácido acético glacial p.a. e 1ml do reagente de ninidrina ácida (1g de ninidrina, 16ml de ácido clorídrico p.a. e 24ml de ácido acético glacial p.a.). Após homogeneização, submeteu-se a mistura ao banho-maria fervente por exatos 10 minutos. Houve desenvolvimento de cor variando do amarelo ao marron-amarelado. Resfriou-se a solução em água gelada e logo após submeteu-se a mesma à leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 470nm, contra branco dos reagentes. As leituras foram transformadas em concentração de ácido siálico ($\mu\text{g/ml}$ de leite) por comparação a uma curva padrão construída com ácido siálico (Type IV 95% Sintetic – Sigma Chemical CO.) (FUKUDA, 1994; FUKUDA et al., 1994). Para a técnica descrita, a diluição final de TCA foi de 12%.

Para se obter a concentração final de 8% misturou-se 20ml de leite e 10ml de TCA 24% (m/v) e para a de 10% tomou-se 14ml de leite e 10ml de TCA 24% (m/v), sendo os demais procedimentos iguais aos descritos acima.

2.1.2. Método CLAE:

Adotou-se a metodologia oficial do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1991). A 10 ml de leite fluido gotejou-se, sob agitação constante, 5ml de TCA 24% (m/v). Deixou-se em repouso por 60 minutos e filtrou-se (papel de filtro Whatman nº. 40), descartando as primeiras gotas do filtrado. Submeteu-se 15-30 μl do filtrado

à corrida cromatográfica em aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência, com injetor manual e “looping” de 100µl, coluna Zorbax GF com 9,4mm de diâmetro interno por 25cm de comprimento, Bio Series da Du Pont e integrador-registrador. A vazão foi de 1ml por minuto e a detecção ocorreu na faixa do UV-VIS, no comprimento de onda de 205nm. A fase estacionária da coluna era constituída por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio estabilizado. A fase ligada era uma monocamada molecular hidrofílica com diâmetro de poro de 150Å. A fase móvel usada na separação foi um padrão fosfato de pH 6 (1,74g de fosfato monoácido de potássio (K₂HPO₄) p.a., 12,37g de fosfato ácido de potássio (KH₂PO₄) p.a. e 21,41g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) dissolvidos em, aproximadamente, 700ml de água didionizada. Ajustou-se o pH da solução para 6, usando solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1N ou solução de hidróxido de sódio (KOH) 50% (m/v). Completou-se o volume para 1000ml com água didionizada. Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45µm e degaseificada. A curva padrão foi elaborada utilizando leite de procedência conhecida e o mesmo leite adicionado de 5%, 10%, 15% e 20% de soro de queijo, conforme recomendado pela metodologia oficial. Construiu-se um gráfico de porcentagem de soro versus a intensidade do sinal do detector (altura do pico), calculando-se a equação daretta de regressão, aceitando valores de $r \geq 0.95$. Comparando-se o cromatograma da amostra com o leite adicionado de soro, identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do soro. A porcentagem de soro na amostra foi calculada por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de soro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos pelo método da ninidrina ácida com 8%, 10% e 12 % de TCA encontram-se na Tabela 2 e os da cromatografia líquida de alta eficiência, apenas para a concentração de 8% de TCA, na Tabela 3, conforme o delineamento proposto (Tabela 1). Foram considerados como

resultados, no método da ninidrina ácida, o valor da absorvância a 470nm e para a cromatografia líquida de alta eficiência, a altura dos picos do cromatograma, cujo tempo de retenção foi ao redor de 6,8 minutos.

Deve-se ressaltar que tanto os leites quanto os soros de queijo, utilizados nesses experimentos, foram oriundos de diferentes fontes, explicando as variações dos resultados. Os coeficientes de variação das duplicatas em cada experimento, foram satisfatórios, sempre inferiores a 10%. Isso significa também que, não havendo segregação de nenhum dos resultados, esse efeito também afetará as correlações e os respectivos coeficientes de correlação obtidos.

O valor médio de $0,162 \pm 0,0283$ de absorvância a 470nm para o leite cru (sem adição de soro), obtido pelo método da ninidrina ácida com 12% de TCA (Tabela 2) se equipara ao valor médio de $0,248 \pm 0,146$ obtido por Fukuda (1994) para leite cru autêntico.

Tabela 2. Valores encontrados pelo método da ninidrina ácida (em absorvância a 470nm) em leite cru sem e com adição de quantidades variáveis de soro de leite e em diferentes concentrações finais de ácido tricloroacético (TCA).

TCA %	Adição de soro %	Absorvância a 470nm *						Média Geral	Desvio Padrão
		E X P E R I M E N T O S							
		I	II	III	IV	V	VI		
8,0	0 - Leite	0,386	0,254	0,316	0,307	0,355	0,353	0,328	0,0464
	2,5	0,439	0,312					0,375	0,0898
	5,0	0,475	0,336	0,435	0,428			0,418	0,0588
	7,5					0,543	0,575	0,559	0,0226
	10,0	0,543	0,458	0,571	0,579			0,538	0,0554
	15,0					0,762	0,664	0,713	0,0693
	20,0	0,738	0,652	0,796	0,760			0,736	0,0612
	30,0					1,127	0,974	1,050	0,1081
	40,0			1,245	1,116			1,180	0,0912
	60,0					1,875	1,576	1,725	0,2114
10,0	0 - Leite	0,235	0,153	0,202	0,188	0,233	0,233	0,207	0,0330
	2,5	0,272	0,205					0,238	0,0474
	5,0	0,327	0,234	0,301	0,297			0,290	0,0395
	7,5					0,405	0,411	0,408	0,0042
	10,0	0,397	0,313	0,437	0,411			0,389	0,0536
	15,0					0,552	0,549	0,550	0,0021
	20,0	0,540	0,462	0,613	0,566			0,545	0,0632
	30,0					0,834	0,756	0,795	0,0551
	40,0			0,917	0,891			0,904	0,0184
	60,0					1,384	1,239	1,311	0,1025
12,0	0 - Leite	0,183	0,112	0,151	0,164	0,169	0,192	0,162	0,0283
	2,5	0,204	0,140					0,172	0,0452
	5,0	0,240	0,164	0,229	0,237			0,217	0,0360
	7,5					0,347	0,330	0,338	0,0120
	10,0	0,266	0,220	0,292	0,324			0,275	0,0439
	15,0					0,439	0,466	0,452	0,0191
	20,0	0,366	0,316	0,450	0,437			0,392	0,0630
	30,0					0,709	0,608	0,658	0,0714
	40,0			0,685	0,695			0,690	0,0071
	60,0					1,103	0,996	1,049	0,0535

* Média de duplicatas

Tabela 3. Valores encontrados pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (em altura do pico) em leite cru sem e com adição de quantidades variáveis de soro de leite e na concentração final de 8% de ácido tricloroacético (TCA).

TCA %	Adição de soro %	Altura do Pico *						Média Geral	Desvio Padrão
		E X P E R I M E N T O S							
		I	II	III	IV	V	VI		
8,0	0 - Leite	4767	2817	2925	3179	2774	3696	3359	768,476
	2,5	8266	7608					7937	465,276
	5	11175	12229	11686	11026			11529	545,367
	7,5					15400	16377	15889	690,843
	10	17107	20998	20917	19311			19583	1824,397
	15					26809	30276	28542	2451,539
	20	30249	40384	39167	35909			36427	4531,426
	30					50837	52401	51619	1106,269
	40			76569	70217			73393	4491,189
	60					105094	102095	103594	2120,967

* Médias de duplicatas

As porcentagens de adição de soro ao leite foram correlacionadas com os resultados obtidos pela metodologia da ninidrina ácida para cada uma das concentrações de TCA utilizadas (Figuras 1, 2 e 3). As regressões lineares obtidas, para um intervalo de confiança de 95%, resultaram em valores de r de 0,996, 0,995 e 0,985, respectivamente para as concentrações de 8%, 10% e 12% de TCA. Conforme pode ser observado nas Figuras 1, 2 e 3, os resultados experimentais evidenciam atendimento aos princípios da Lei de Beer/Lambert, segundo os quais há correspondência entre concentração e absorção de substâncias em comprimento de onda definidos, proporcional à concentração, uma vez que a absorvidade (a) é uma característica da substância, confirmando a viabilidade desta metodologia para a determinação quantitativa da adição de soro de queijo ao leite.

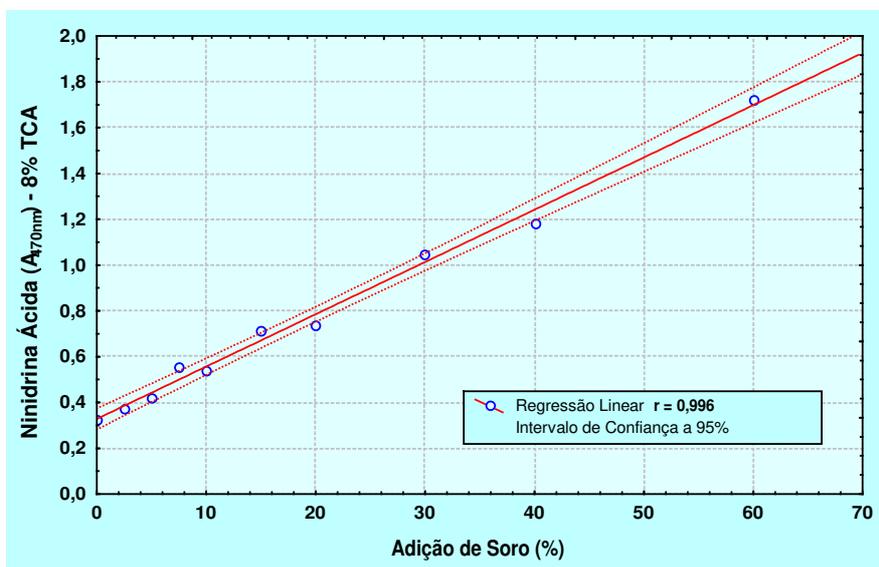


Figura 1. Correlação entre a adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da ninidrina ácida, utilizando a concentração de 8% de TCA e leitura espectrofotométrica a 470nm.

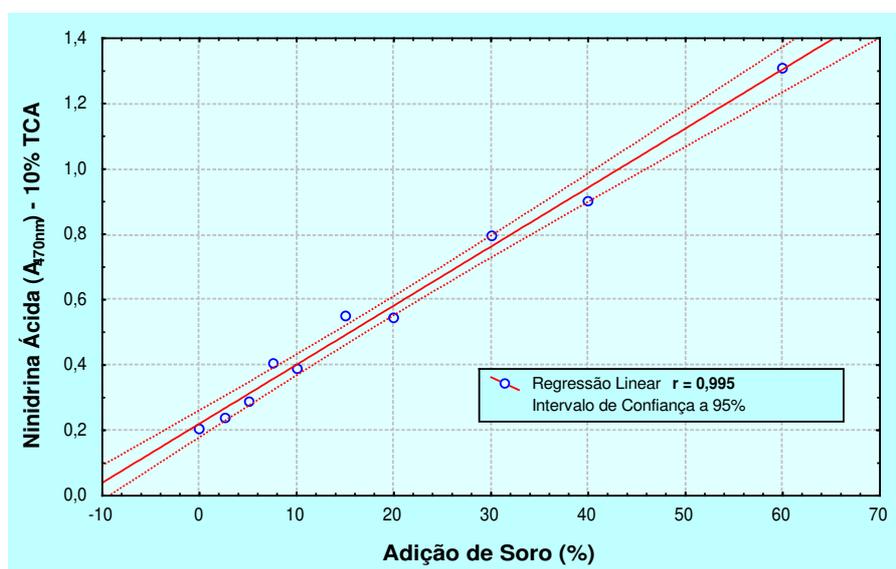


Figura 2. Correlação entre a adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da ninidrina ácida, utilizando a concentração de 10% de TCA e leitura espectrofotométrica a 470nm.

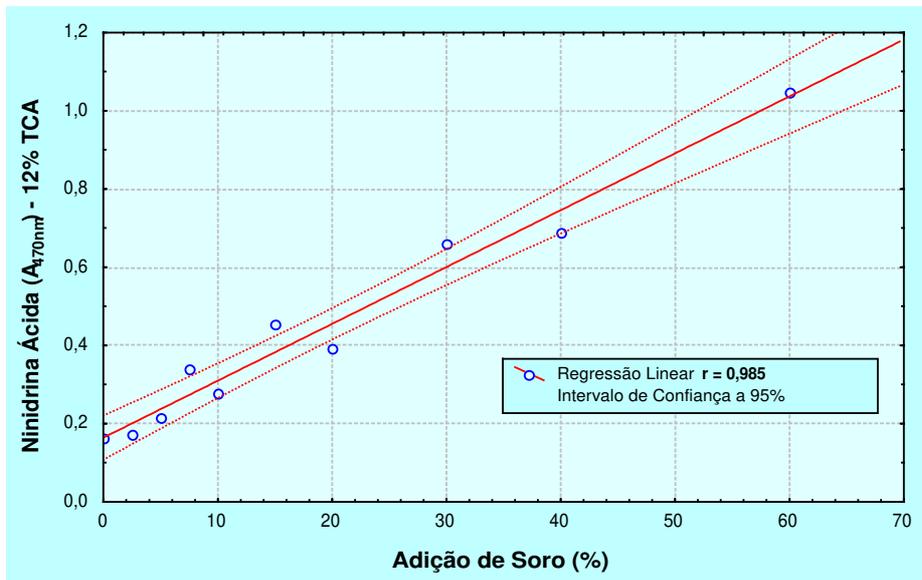


Figura 3. Correlação entre a adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da ninidrina ácida, utilizando a concentração de 12% de TCA e leitura espectrofotométrica a 470nm.

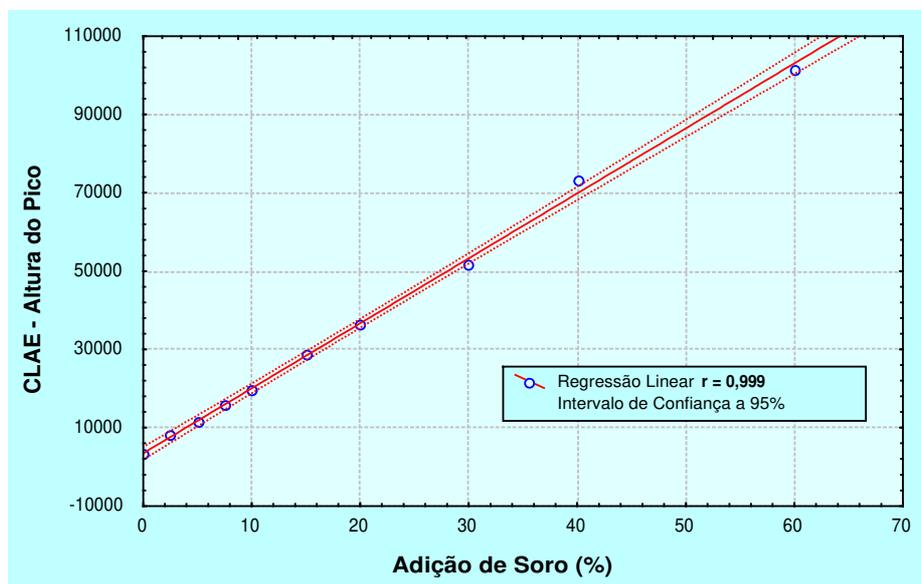


Figura 4. Correlação entre a adição de diferentes porcentagens de soro de queijo ao leite e os resultados obtidos para a pesquisa dessa fraude pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando a concentração de 8% de TCA e leitura da altura do pico.

Os valores de r obtidos apresentaram uma pequena diferença entre eles. A utilização da concentração de 8% de TCA apresentou a melhor resposta, o que representa uma economia da quantidade de reagente, tornando a metodologia mais barata, além de coincidir com a concentração de TCA indicada por van Hooydonk & Olieman (1982) que afirmaram ser esta a concentração final ótima. A concentração de 12% de TCA conforme descrita na técnica original de Fukuda et al. (1994), apresentou um valor de r menor.

A Figura 4 mostra a correlação da adição de soro ao leite com os resultados obtidos pela metodologia cromatográfica, confirmando a precisão da prova, por um valor de r de 0,999 para um intervalo de confiança de 95%.

A análise cromatográfica apresentou o maior índice de correlação dos quatro casos, no entanto a diferença entre eles é pequena principalmente na comparação entre a CLAE e a análise por ninidrina ácida e 8% de TCA, respectivamente 0,999 e 0,996.

Os valores obtidos com a metodologia espectrofotométrica com ninidrina ácida foram correlacionados com os valores obtidos com a metodologia CLAE (Figuras 5, 6 e 7). Os valores de r encontrados foram altamente satisfatórios, sendo de 0,993, 0,992 e 0,981 para as concentrações de TCA de 8, 10 e 12%, respectivamente, salientando-se que a primeira apresentou um resultado ligeiramente superior. Isto significa que todas as variações no teor de CMP que são acusadas pela cromatografia CLAE terão uma correspondência de alta confiabilidade no teor de ácido siálico obtido espectrofotometricamente e, mesmo considerando-se a de menor índice de correlação, verifica-se que o coeficiente de determinação entre as técnicas foi da ordem de 96% dos resultados. As equações determinantes para as retas obtidas foram respectivamente, $CLAE = -20478,9 + 73033,2 \times A_{470nm}$, $CLAE = -16687,3 + 92024,6 \times A_{470nm}$ e $CLAE = -14152,2 + 112007,2 \times A_{470nm}$, para 8, 10 e 12% de TCA.

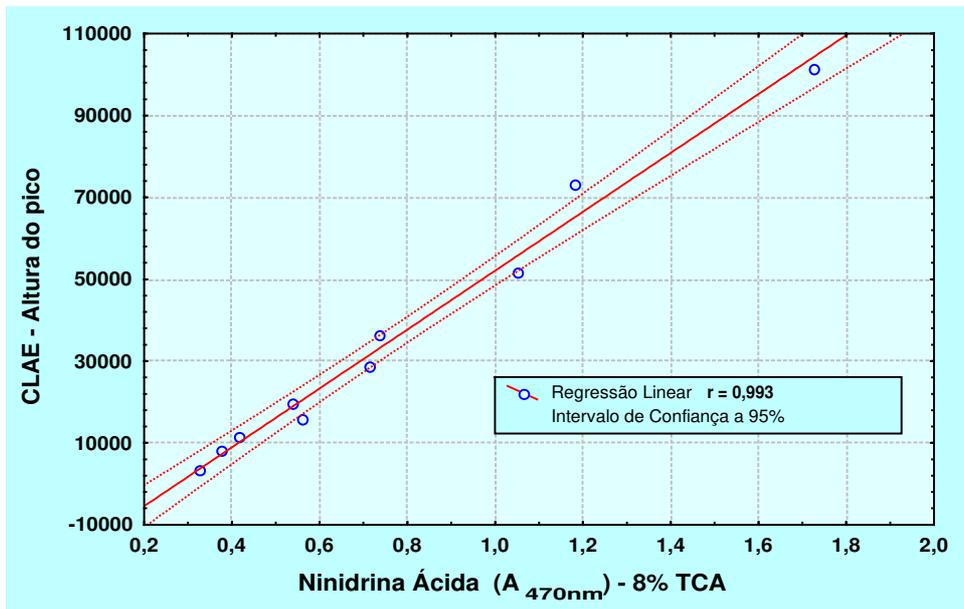


Figura 5. Correlação entre os métodos de ninidrina ácida com concentração final de 8% de TCA e cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE na pesquisa de fraudes por adição de soro ao leite.

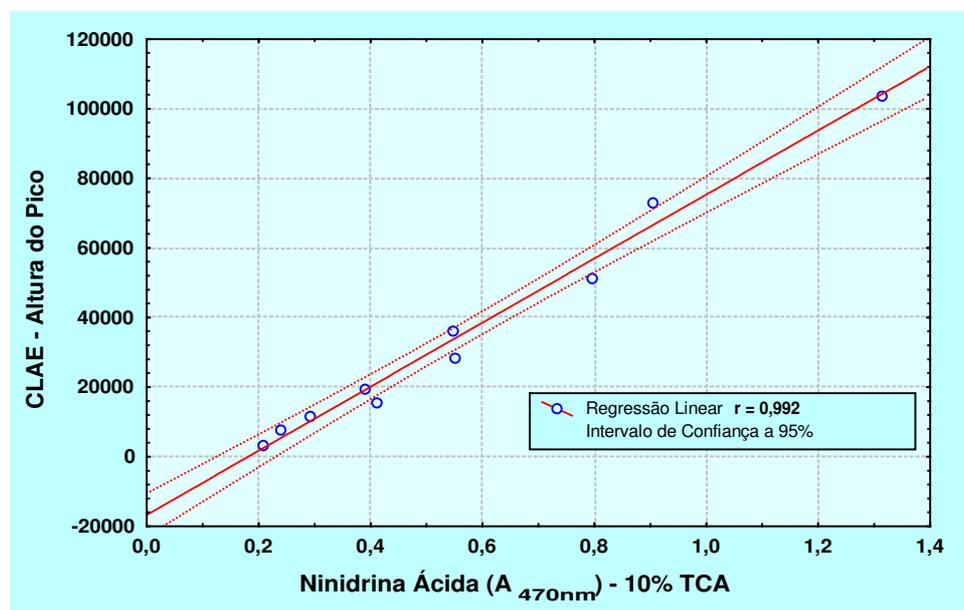


Figura 6. Correlação entre os métodos de ninidrina ácida com concentração final de 10% de TCA e cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE na pesquisa de fraudes por adição de soro ao leite.

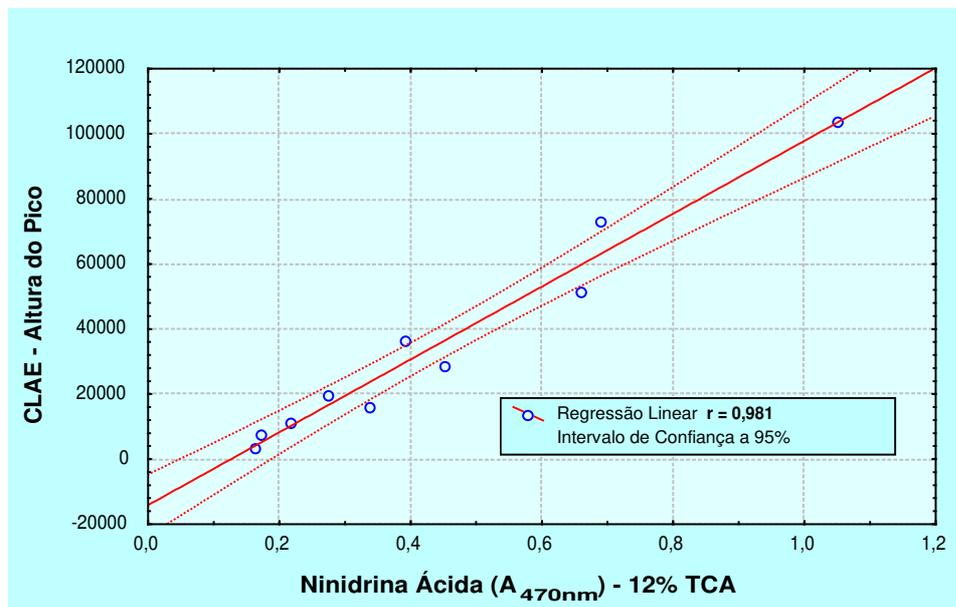


Figura 7. Correlação entre os métodos de ninidrina ácida com concentração final de 12% de TCA e cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE na pesquisa de fraudes por adição de soro ao leite.

Os resultados obtidos com a metodologia espectrofotométrica permitem também sugerir a modificação da metodologia de Fukuda (1994) para uma concentração final de TCA de 8%, a qual, além de apresentar o melhor índice de correlação com a metodologia CLAE, tem igualmente um menor custo. Deve-se, entretanto, observar que com o uso de TCA na concentração de 12% a correlação é também bastante satisfatória ($r = 0,981$).

Como nos diversos experimentos foi utilizado leite de diferentes localidades, a correlação entre as duas metodologias pode ser considerada bastante confiável, mesmo considerando-se as observações de Guine & Wilkinson (1992) acerca da heterogeneidade da κ -caseína, suas 2 variantes genéticas A e B e o teor de carboidratos na molécula, que pode variar em até 15%.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados, no presente experimento, permitem concluir que o método da ninidrina ácida pode ser considerado tanto como uma metodologia de “screening” quanto uma metodologia substituta para a detecção de adição de soro em leite, deixando a cromatografia líquida de alta eficiência, processo oneroso e que exige mão de obra qualificada, para os casos duvidosos ou contra-provas laboratoriais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº 124, 23 set.1991. Aprova métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. **Diário Oficial da União**, 20 nov. 1991, p. 26.245.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária nº 22, 14 abr. 2003. Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 02 mai. 2003, p.3-25.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**: bioquímica, propriedades funcionais, valor nutricional, modificações químicas. Zaragoza: Ed. Acribia, 1989, p.179-216.

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

FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1370-1400, 1989.

FOX, P.F. Chemistry of the caseins. In: **Advanced Dairy Chemistry – 1: Proteins**. 1.ed. London, Blackie Academic & Professional, 1992, cap.2, p.63-110.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk Proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998, cap. 4, p.146-237.

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

FUKUDA, S.P.; ROIG, S.M.; PRATA, L.F.; Metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. In: Congresso Nacional de Laticínios, 12^o., Juiz de Fora/MG. **Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios**. p.114-119, 1994.

FUKUDA, S.P.; ROIG, S.M.; PRATA, L.F.; Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para a detecção da adição de soro ao leite. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA** , v.16, n.1, p.52-56, 1996.

FURLANETTI, A.; PRATA, L.F.; Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA**, no prelo.

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

LÉONIL, J.; MOLLÉ, D. A method for determination of macropeptide by cation-exchange fast protein liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. **Journal of Dairy Research**, v.58, n.3, p.321- 328, 1991.

LIESKE, B.; KONRAD, G. A new method to estimate caseinomacropeptide and glycomacropeptide from trichloroacetic acid filtrates. **Milchwissenschaft**, v.51, n.8, p.431-435, 1996.

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 Dairy Journal**, v.37, p.27-36, 1983.

PRATA, L.F. **Distribuição de GMP livre, em leites crus e pasteurizados, na definição da detecção de fraudes por adição de soro.** Jaboticabal, 2002. 104p. Tese (Livre Docência em Inspeção de Alimentos de Origem Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

SHAMMET, K.M.; BROWN, R.J. ; MAHON, D.J. Mc. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on κ -casein. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1373-1379, 1992.

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

WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; PINTO, A.P.E.F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v.5, n. 2, p.111-115, 1985.

YAO, K.; UBUKA, T.; MASUOKA, N.; KINUTA, M.; IKEDA, T. Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. **Analytical Biochemistry**, v.179, p.332-335, 1989.

Este capítulo foi encaminhado para publicação no periódico Le Lait. (Recebido pela revista em 22/09/03).

CAPÍTULO III

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE PESQUISA DE PROTEÓLISE EM LEITE UAT

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE PESQUISA DE PROTEÓLISE EM LEITE UAT

RESUMO

O aumento dos teores de glicomacropeptídeo e caseinomacropeptídeo – (GMP/CMP) livres, detectados na adição fraudulenta de soro de queijo ao leite ou decorrente da sua proteólise, pode ser pesquisado através de técnicas similares. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo dos níveis de GMP e CMP encontrados no leite UAT, através dos métodos da ninidrina ácida e da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), durante o período de processamento e estocagem, partindo-se de leite cru, do leite UAT logo após a ultrapasteurização e, mensalmente, até o final de seu prazo de validade. Observou-se inicialmente uma queda dos níveis de GMP e CMP livres em ambos os métodos, entre os leites crus e recém processados, seguida de aumento significativo dos mesmos, com o decorrer do prazo de validade. O coeficiente de correlação determinado entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de 0,965, mostrando a elevada correspondência, confirmado pelo coeficiente de determinação da ordem de 0,93.

Palavras-chave: Leite. Fraude. Adição de soro. Proteólise. Ninidrina. CLAE.

Summary

The increase of free GMP (glycomacropeptides) and CMP (caseinmacropeptides) levels can be detected in the fraudulent addition of cheese whey to the milk or in the milk proteolysis through similar techniques. The present work purposed to establish a comparative study of the levels of GMP and CMP found in the UAT milk, through the acid ninhydrin method and HPLC (High Performance Liquid Chromatography) during the processing and storage phase. Raw milk and UAT milk recently processed and every month until the end of its shelf life were analyzed. Initially it was observed a decrease of the levels of free

GMP and CMP in both methods among the raw milk and recently processed milk, followed by a significant increase of the proteolysis levels, along the period of its shelf life. A linear correlation coefficient observed was 0,965, showing a very high inter-correspondence between both methods, better estimated by determination coefficient of 0,93.

Word-key: Milk. Fraud. Whey addition. Proteolysis. Acid Ninhydrin. HPLC.

1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos vem sendo adotado, no Brasil, a coleta granelizada do leite cru resfriado diretamente nas fazendas, em carros-tanque, seja logo após a ordenha ou dentro de 24-72 horas. Esse procedimento cria condições seletivas para o crescimento de bactérias psicrótróficas, particularmente *Pseudomonas spp*, as quais podem rapidamente dominar a microflora e apresentar considerável potencial deteriorativo (Neil, 1974, citado por ROWE et al., 2001). A maioria dessas bactérias não é patogênica, mas quando cresce no leite ou nos produtos lácteos, pode produzir uma variedade de aromas e sabores desagradáveis, redução do rendimento de queijos e geleificação em leite UAT. Muitas produzem proteinases e lipases estáveis ao calor, capazes de resistir aos tratamentos térmicos comerciais, ainda que as bactérias produtoras dessas enzimas sejam destruídas (LAW, 1979; ROWE et al., 2001).

A síntese dessas enzimas extracelulares ocorre numa ampla faixa de temperatura de crescimento, mas a maioria dos estudos indica o ótimo entre 20-30°C, embora considerável síntese também ocorra em temperatura mais baixa, por exemplo, a produção de proteinases por *P. fluorescens* a 5°C foi de 55% da encontrada a 20°C (CROMIE, 1992).

Considerando a estocagem do leite a uma temperatura de 4-6°C por 48 horas, o desenvolvimento de psicrótróficos em temperaturas baixas e que estes são os responsáveis pela formação de enzimas termorresistentes, Mottar (1984) avaliou como a matéria-prima, estocada nessas condições, influenciou sobre a conservação do leite UAT, concluindo que: (1) em relação ao leite cru de boa qualidade (menos de 10^4 ufc/ml e 2×10^3 de psicrótróficos) a atividade proteolítica observada, mais no leite cru do que no leite UAT correspondente, foi atribuída à ação do sistema proteolítico do leite; (2) numa matéria-prima de boa qualidade, estocada sob refrigeração por mais de 72 horas, observou-se um aumento da atividade residual no leite UAT correspondente. Para leite de pior qualidade (com mais de 10^5 ufc/ml), um aumento de atividade análoga foi observado após estocagem por 48 horas, podendo ser comprovado pelo desenvolvimento notável

da flora psicotrófica e (3) aumento do teor de ácido siálico, observado conjuntamente com o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos proteolíticos, levaram a supor que as proteases bacterianas termoestáveis degradaram uma grande quantidade da fração κ -caseína e que o mesmo não seria resultado da ação das proteases naturais do leite.

Segundo Zalazar et al. (1993) a geleificação do leite UAT é causada pela ação de enzimas termorresistentes, cujo mecanismo é similar à coagulação do leite pela renina. Como conseqüência dessa similaridade, entre a ação proteolítica das proteases bacterianas psicotróficas e a coagulação pela renina, pode-se esperar que, durante a estocagem refrigerada do leite cru, a concentração do ácido siálico solúvel aumente, especialmente se for por vários dias.

Recio et al. (2000) relataram que os princípios peptídeos oriundos da ação de proteases de psicotróficos sobre a κ -caseína foram separados por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) e eletroforese capilar (CE) e identificados por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS). Houve coincidência com produtos de degradação previamente encontrados em leite UAT estocado. Os resultados demonstraram que as enzimas psicotróficas hidrolisam a caseína na ligação 105-106, levando à formação do caseinomacropeptídeo (CMP), apesar de serem menos específicas que a quimosina e também clivam as ligações 103-104, 104-105, 106-107 e 107-108. Desse modo, a presença de CMP em leite UAT pode não ser considerada indicadora exclusiva de adulteração com soro, apesar da medida da área dos picos do cromatograma, das diferentes formas *CMP-like* presentes, possibilitar a detecção do acréscimo de sólidos de soro.

Zalazar et al. (1993), trabalhando com contagens totais de mesofílicos e de psicotróficos, com determinação do teor de ácido siálico e características da coagulação pela renina, em amostras de leites crus e termizados (65°C por 4 minutos), ambos estocados por 6 dias a 5°C, afirmaram que o aumento do teor

de ácido siálico solúvel durante a estocagem refrigerada pode ser usada como um indicador da ação proteolítica de bactérias psicotróficas sobre o leite.

Nakano & Ozimek (1999), estudando o GMP por cromatografia em gel, relataram que a maior parte do ácido siálico presente na fração não dializável de soro doce era constituída por GMP-ácido siálico, concluindo que a determinação deste açúcar é importante para estimar a concentração de glicomacropéptideo (GMP) presente.

O estudo do comportamento do ácido siálico, em leite inoculado com cultura de *Pseudomonas* e tratado termicamente pelo sistema VTIS (método direto de aquecimento) no qual ocorreu geleificação, evidenciou um aumento da quantidade de ácido siálico no soro. Nenhum aumento de ácido siálico em soro de leite não inoculado e tratado pelo sistema citado foi observado durante o mesmo período de tempo. Como a decomposição da caseína foi muito maior do que a das proteínas do soro, isso indicou que a primeira a ser atacada pela enzima foi a caseína. O ataque das proteases resultou em coagulação do leite inoculado e tratado pelo sistema VTIS e em aumento da quantidade de ácido siálico. Isto significa que as proteases atacaram a caseína no mesmo lugar na κ -caseína, como na ação da renina. Tanto a coagulação quanto o aumento de ácido siálico no leite inoculado e tratado puderam, portanto, ser atribuídos à atividade enzimática desenvolvida pela cultura de pseudomonas (BENGTSSON et al., 1973).

Olieman & Bedem (1983) verificaram que a proteólise por enzimas bacterianas pode causar um aumento do teor de GMP. Mottar et al. (1985) também observaram que bactérias psicotróficas Gram-negativas produzem enzimas proteolíticas termorresistentes, as quais alteram o cromatograma do CLAE na determinação do valor do GMP.

Olieman & Bedem (1983), aplicando o método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, compararam o comportamento cromatográfico de leite cru com menos de 24 horas de obtenção com o de leite cru estocado por 4 dias a 5-7° C. Houve um aumento do componente atribuído à formação do GMP e esse

pico apresentou, após um certo nível de proteólise, uma cisão em decorrência de uma alteração no tempo de retenção. O aumento deste último componente foi atribuído à formação de certos peptídeos que são típicos da atividade de proteinases bacterianas.

Mottar et al. (1985) correlacionando contagem total de bactérias, contagem de psicotróficos, contagem de microrganismos Gram-negativos e teor de ácido siálico, medido espectrofotometricamente pela complexação com o resorcinol, com os componentes de lise da proteína de amostras de leite cru refrigerado de diferentes idades e qualidades microbiológicas, analisados por CLAE, observaram que: (a) proteólise em leite pode ser causada por proteinases do próprio leite e/ou bacterianas, sendo a contribuição de proteinases nativas do leite, para a formação dos componentes citados por Olieman & Bedem (1983), pequena em comparação com as de origem bacteriana; (b) esses componentes são formados em alto nível pela atividade das bactérias presentes no leite; (c) o nível de proteínas lisadas foi maior pela ação dos psicotróficos Gram-negativos do que pela flora bacteriana como um todo, levando a concluir que os psicotróficos Gram-negativos são responsáveis pela produção de enzimas proteolíticas; (d) o nível de ácido siálico tem alta correlação com os 2 produtos proteolíticos formados e que esse nível deve ser no máximo de 4.000µg/kg, pois em concentrações maiores há perigo de presença de enzimas bacterianas termorresistentes, o que pode afetar a vida de prateleira de leite UAT elaborado a partir dessa matéria-prima e (e) reportando-se à curva padrão e às equações da reta encontradas em seu experimento, visando atender o nível citado acima, sugere como valor relativo máximo 1,90 para o primeiro componente e 1,30 para o segundo; os componentes provenientes da lise de proteínas são muito levemente afetados no processo UAT;

Em 1994, Fukuda et al. propuseram o método da ninidrina ácida para a determinação espectrofotométrica quantitativa do ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico (NANA) livre ou ligado a glicoproteína de leite fluido e soro, na região do visível do espectro, a 470nm.

Fukuda et al. (1996) consideraram normal leite com concentração de ácido siálico até 5,14µg/ml de leite. Acima deste valor poderia ser suspeito (até 10,64µg/ml) ou positivo para adição de soro.

Vilder et al. (1988) também usaram a técnica de CLAE para determinar soro obtido por coagulação pela renina em creme e leite ácido. Recio et al. (1996, 2000) estudaram as alterações da proteína em leite UAT utilizando a eletroforese capilar, comparando os resultados obtidos com a metodologia clássica do CLAE e afirmaram que a presença de CMP em leite UAT não pode ser considerada indicação exclusiva de adulteração com soro.

Fukuda et al. (dados em fase de publicação) obtiveram excelente correlação, de 0,993, entre os métodos CLAE e ninidrina ácida utilizados para determinar a adição fraudulenta de soro ao leite, sendo que o método da ninidrina ácida determina, quantitativamente por espectrofotometria, o ácido siálico livre e o ligado ao GMP e a cromatografia líquida de alta eficiência determina o CMP.

Neste trabalho teve-se por objetivo avaliar, pelos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e da ninidrina ácida, a evolução da proteólise e conseqüente formação de GMP/CMP em leite UAT, ao longo da sua vida útil, a partir do leite cru que lhe deu origem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite integral cru e de seu respectivo leite UAT foram coletadas em sete períodos diferentes, numa planta de ultrapasteurização da região norte do Estado de São Paulo. Cada lote de processamento (com exceção do experimento VII) foi constituído da carga de dois caminhões-tanque (23-25.000 litros cada), provenientes de seis diferentes pontos de coleta (designados por A à F) ou postos de resfriamento, todos sob inspeção oficial, com tempo estimado de viagem variando de 1 a 15 horas, apresentando uma temperatura ao redor de 5°C na chegada ao estabelecimento final. As amostras de leite cru resfriado do tanque de estocagem (50.000 litros) da indústria foram coletadas,

certificando-se que esses leites alimentavam a unidade UAT. Em seguida, amostras de leite UAT, logo após o processamento térmico de ultrapasteurização pelo método de injeção direta de vapor (150°C/4 segundos) e envase em embalagens cartonadas assépticas, foram coletadas para análises no dia da produção e para o acompanhamento durante o tempo de vida de prateleira do produto.

Todas as amostras foram encaminhadas ao laboratório, sendo que as amostras de leite cru resfriado foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo. As embalagens cartonadas foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento das respectivas análises.

Ao chegar no laboratório, no mesmo dia, as amostras (leite cru resfriado, leite UAT no dia da produção), em duplicatas, foram submetidas à pesquisa de ácido siálico pela técnica da ninidrina ácida. Amostras idênticas foram congeladas em freezer doméstico (-14 a -18°C) até o momento de ser realizada a cromatografia líquida de alta eficiência. Mensalmente, por um período de 5 meses, as amostras estocadas e pertencentes aos respectivos lotes originais, foram processadas do mesmo modo.

As técnicas da pesquisa de ácido siálico pelo método da ninidrina ácida e pela CLAE estão descritas em Fukuda et al. (1994, 1996) e Portaria nº 124 de 23 de setembro de 1991 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1991) respectivamente. Ambas as técnicas foram regulamentadas através da Instrução Normativa n. 22 de 14/04/03 que dispõe sobre os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2003).

2.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1.1 - Método da ninidrina ácida:

A cada 10 ml de leite acrescentou-se, sob agitação, 10ml de ácido tricloroacético – TCA a 24% (m/v). Após homogeneização e repouso por 30 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro (Whatman nº. 40). Tomou-se 10ml do filtrado desproteínizado, colocou-os em tubos de centrífuga (não cônicos) e adicionou-se 1ml de ácido fosfotúngstico a 20% (m/v). Seguiu-se centrifugação a 3.500 rpm por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e dispersou-se o sedimento com 6ml de álcool etílico 95% (v/v). Procedeu-se à nova centrifugação por 10 minutos. Desprezou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se, ao resíduo, 2ml de ácido acético glacial p.a. e 1ml do reagente de ninidrina ácida (1g de ninidrina, 16ml de ácido clorídrico p.a. e 24ml de ácido acético glacial p.a.). Após homogeneização, submeteu-se a mistura ao banho-maria fervente por exatos 10 minutos. Houve desenvolvimento de cor variando do amarelo ao marron-amarelado. Resfriou-se a solução em água gelada e logo após submeteu-se a mesma à leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 470nm, contra branco dos reagentes. As leituras foram transformadas em concentração de ácido siálico (µg/ml de leite) por comparação a uma curva padrão construída com ácido siálico (Type IV 95% Sintetic – Sigma Chemical CO.) (FUKUDA, 1994; FUKUDA et al.,1994). Para a técnica descrita, a diluição final de TCA foi de 12%.

Para se obter a concentração final de 8% misturou-se 20ml de leite e 10ml de TCA 24% (m/v) e para a de 10% tomou-se 14ml de leite e 10ml de TCA 24% (m/v), sendo os demais procedimentos iguais aos descritos acima.

2.1.2 - Método CLAE:

Adotou-se a metodologia oficial do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1991). A 10 ml de leite fluido gotejou-se, sob agitação constante, 5ml de TCA 24% (m/v). Deixou-se em repouso por 60 minutos e filtrou-se (papel de filtro Whatman nº. 40), descartando as primeiras gotas do filtrado. Submeteu-se 15-

30µl do filtrado à corrida cromatográfica em aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência, com injetor manual e “looping” de 100µl, coluna Zorbax GF com 9,4mm de diâmetro interno por 25cm de comprimento, Bio Series da Du Pont e integrador-registrador. A vazão foi de 1ml por minuto e a detecção ocorreu na faixa do UV-VIS, no comprimento de onda de 205nm. A fase estacionária da coluna era constituída por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio estabilizado. A fase ligada era uma monocamada molecular hidrofílica com diâmetro de poro de 150Å^o. A fase móvel usada na separação foi um padrão fosfato de pH 6 (1,74g de fosfato monoácido de potássio (K₂HPO₄) p.a., 12,37g de fosfato ácido de potássio (KH₂PO₄) p.a. e 21,41g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) dissolvidos em, aproximadamente, 700ml de água bidionizada. Ajustou-se o pH da solução para 6, usando solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1N ou solução de hidróxido de sódio (KOH) 50% (m/v). Completou-se o volume para 1000ml com água bidionizada. Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45µm e degaseificada. A curva padrão foi elaborada utilizando leite de procedência conhecida e o mesmo leite adicionado de 5%, 10%, 15% e 20% de soro de queijo, conforme recomendado pela metodologia oficial. Construiu-se um gráfico de porcentagem de soro versus a intensidade do sinal do detector (altura do pico), calculando-se a equação da reta de regressão, aceitando valores de $r \geq 0.95$. Comparando-se o cromatograma da amostra com o leite adicionado de soro, identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do soro. A porcentagem de soro na amostra foi calculada por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de soro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados do leite cru que deu origem ao leite UAT utilizado no experimento encontram-se na Tabela 1. Como pode ser observado, o valor médio dos índices crioscópicos encontravam-se dentro dos parâmetros normais, garantindo a qualidade físicoquímica do leite cru. No entanto, houve uma grande

variação do tempo de viagem, isto é, o período compreendido entre o momento em que o caminhão-tanque foi carregado, desconsiderando o tempo que o leite já estava estocado resfriado em tanque isotérmico estacionário, e o seu descarregamento na unidade beneficiadora, podendo aí ter sido imediatamente beneficiado ou então filtrado, resfriado e estocado novamente. Essa permanência de várias horas à temperatura de resfriamento, sem considerar a qualidade higiênica da matéria-prima, favorece o desencadeamento de um processo proteolítico.

Tabela 1. Características do leite cru quando do seu recebimento na planta beneficiadora de UAT.

Experimentos	Procedência do Leite	Tempo de Viagem	Temperatura de Chegada	Crioscopia ¹
		Horas	°C	°H
I	A	13h **	5°C	-0,533
	B	15h **	5°C	-0,536
II	C	5h *	5°C	-0,533
	B	1h **	5°C	-0,532
III	D	7h *	5°C	-0,532
	A	8h *	5°C	-0,537
IV	C	5h *	5°C	-0,537
	B	8h **	5°C	-0,531
V	B	7h30min**	5°C	-0,534
	E	1:40 **	5°C	-0,541
VI	C	5h *	5°C	-0,532
	B	6h *	6°C	-0,534
VII	B	10h **	5°C	-0,532
	F	10h **	5°C	-0,541
	B	10h **	5°C	-0,533

* Tempo estimado de viagem

** Tempo transcorrido entre a saída da origem e o descarregamento no estabelecimento beneficiador

¹ Índice Crioscópico: média dos 3 compartimentos do caminhão-tanque

Tabela 2. Resultados de leite cru resfriado submetido às metodologias de ninidrina ácida e CLAE, com cálculo pela equação da reta da altura do pico esperada, com intervalo de 95% de confiança.

Experimento	ÁCIDO SIÁLICO		CMP	
	Absorbância	Concentração*	Esperado**	Obtido
	470nm	µg/ml	Alt.Pico	Alt.Pico
I	0,294	5,03	18.778	29.378
II	0,287	4,90	17.994	32.669
III	0,221	3,69	10.601	18.095
IV	0,398	6,93	30.427	40.796
V	0,234	3,92	12.058	30.354
VI	0,253	4,27	14.186	44.012
VII	0,232	3,89	11.834	36.878

* Concentração calculada pela equação da reta: Absorbância = 0,0201 + 0,0109 x Concentração

** Calculado pela equação da reta: Altura do Pico = -14152,2 + 112007,2 x A_{470nm}

A Tabela 2 apresenta os dados de absorbância a 470nm e a correspondente concentração de ácido siálico obtida para o leite cru e a altura dos picos cromatográficos obtidos e esperados, pela correlação apresentada por Fukuda (2003, dados em fase de publicação) para esse leite.

Os resultados do teste da ninidrina ácida no leite cru resfriado acusaram concentrações acima do “*screening*”, proposto por Fukuda et al. (1996), para a categoria de suspeito de fraude por adição de soro, apenas no experimento IV. No entanto, as alturas dos picos dos cromatogramas de todos os experimentos apresentaram um aumento excessivo, variando de 34,1% (experimento IV) até 200% (experimentos VI e VII), que pode ser evidenciado quando comparadas aos valores esperados, obtidos pela equação da reta (FUKUDA, 2003 – dados em fase de publicação). Essa disparidade na correlação entre os resultados das

duas metodologias, não se explica, pois mesmo que se aventasse a hipótese de que o leite poderia estar em avançado processo de proteólise, baseados nas informações da Tabela 1, não se justifica que não tenha ocorrido também liberação de ácido siálico.

Outro ponto não explicado é que o leite dos experimentos II, IV e VI, provenientes da mesma região, apresentam uma concentração de 4,9, 6,93 e 4,27 μ g de ácido siálico/ml de leite, respectivamente, não correspondente à altura do pico, cujo menor aumento ocorreu justamente no leite que acusou a maior concentração (experimento IV).

A única diferença entre as amostras analisadas pelos dois métodos é que as que foram submetidas à ninidrina ácida não foram congeladas e foram analisadas no dia da coleta, enquanto que as para o CLAE foram congeladas e permaneceram neste estado por pouco mais de 1 mês, período que o leite sofre acentuada instabilidade protéica.

Os resultados obtidos com a realização dos 7 experimentos, em absorbância a 470nm e respectiva concentração de ácido siálico (μ g/ml de leite) pelo método da ninidrina ácida e em altura do pico cromatográfico ao longo da vida útil de cinco meses do produto, estão apresentados na Tabela 3.

A comparação dos valores obtidos para as amostras de leite cru e o correspondente leite UAT, no dia de produção, mostrou uma variação tanto nos resultados obtidos pelo método da ninidrina ácida como pelo método CLAE (Tabela 3). No método da ninidrina ácida foi observado, em geral, uma diminuição, com exceção do experimento III, nos quais o teor de ácido siálico nos respectivos leites UAT foi respectivamente menor de 2,2 a 22,2%. Já pelo método CLAE a variação foi sempre de diminuição, muito mais acentuada, variando de 49,7 a 83,1%. Não ficou esclarecida a razão desta discrepância, a qual em parte poderia ser oriunda do efeito do tratamento térmico dado ao leite UAT e em parte devida ao efeito que poderia ter o congelamento da amostra, do leite recém processado, até o momento da realização da análise CLAE.

Tabela 3 - Valores encontrados pelo método da ninidrina ácida (em absorvância a 470nm e concentração de ácido siálico) e pela cromatografia líquida de alta eficiência (altura do pico de CMP) para leites crus e UAT correspondentes durante o prazo de validade comercial.

Leite	Data	E X P E R I M E N T O S													
		I		II		III		IV		V		VI		VII	
		A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³	A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³	A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³	A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³	A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³	A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³	A _{470 nm} ¹ Conc. ²	Alt. Pico ³
Cru	Coleta	0,294 5,03	29.378	0,287 4,90	32.669	0,221 3,69	18.095	0,398 6,93	40.796	0,234 3,92	30.354	0,253 4,27	44.012	0,232 3,89	36.878
UAT	Produção	0,242 4,07	6.252	0,281 4,79	11.345	0,227 3,80	9.104	0,314 5,39	14.473	0,200 3,30	5.819	0,247 4,16	8.765	0,220 3,67	6.244
UAT	1 mês	0,379 6,59	17.321	0,677 12,05	50.113	0,414 7,23	22.491	0,807 14,44	71.768	0,505 8,90	35.470	0,522 9,21	29.874	0,646 11,48	43.132
UAT	2 meses	0,462 8,11	25.215	0,965 17,34	69.841	0,560 9,91	33.293	1,088 19,59	83.522	0,832 14,90	46.293	0,63 11,19	37.310	0,747 13,34	57.265
UAT	3 meses	0,518 9,14	30.789	0,993 17,85	80.097	0,596 10,57	39.804	1,024 18,42	88.935	0,710 12,66	53.714	0,618 10,97	43.838	1,030 18,53	67.084
UAT	4 meses	0,550 9,72	32.264	1,077 19,39	87.274	0,692 12,33	43.279	1,095 19,72	92.786	0,769 13,74	60.020	0,770 13,76	46.466	0,971 17,45	71.034
UAT	5 meses	0,645 11,47	35.989	1,165 21,01	89.572	0,790 14,13	47.772	0,911 16,35	94.550	0,907 16,27	60.497	0,732 13,06	48.183	0,931 16,71	74.130

¹ A_{470 nm} = Absorvância a 470 nm obtida pelo método da ninidrina ácida

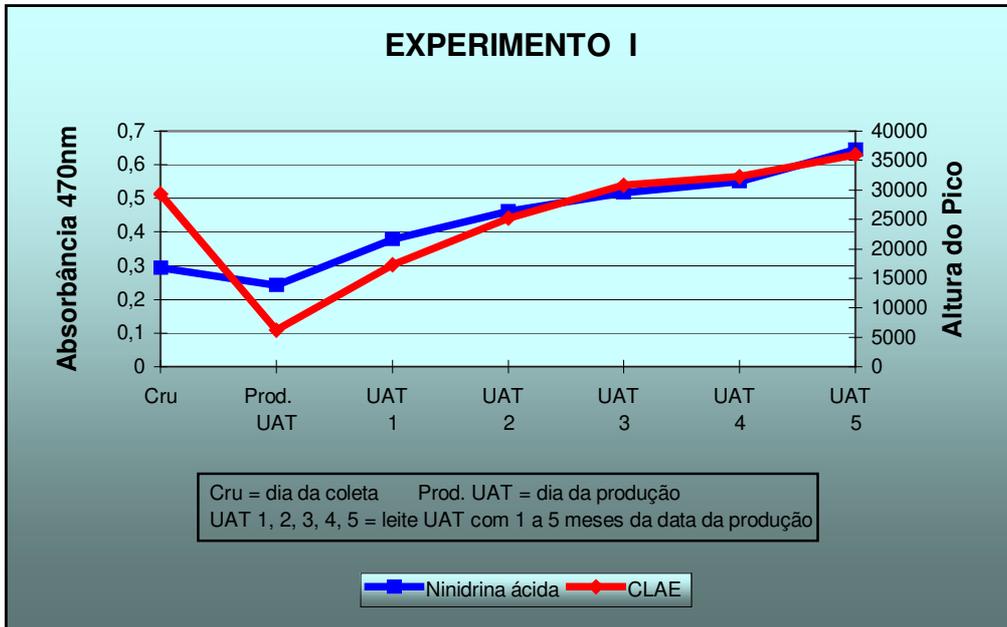
² Conc. = Concentração em µg ácido siálico/ml de leite, calculada pela equação da reta: Absorvância = 0,0201 + 0,0109 x Concentração

³ Alt. Pico = Altura do pico do cromatograma da cromatografia líquida de alta eficiência, no tempo de retenção de 6,8 minutos

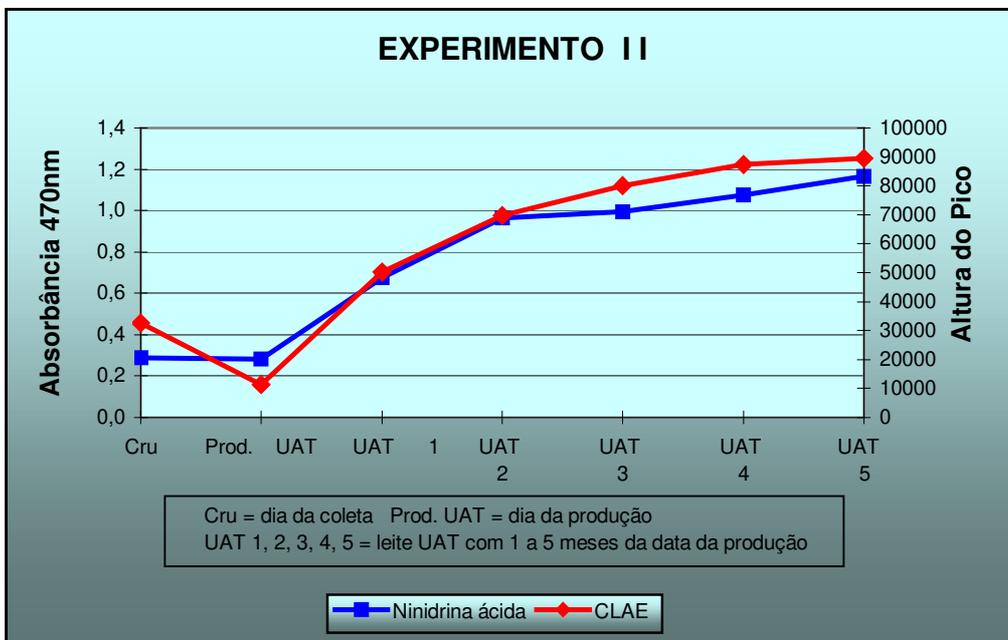
Os sete experimentos mostram o aumento do teor de ácido siálico, a partir do dia de produção, com o avanço do prazo de validade, demonstrando que há contínua liberação de GMP. A partir da data de produção, os dados obtidos por ambos os métodos, mostram uma similaridade de comportamento na avaliação tanto do ácido siálico/GMP livre pelo método da ninidrina ácida como de liberação de CMP/GMP pelo método CLAE (Figuras 1 a 7).

Os dados obtidos a partir do dia de produção pela metodologia da ninidrina ácida foram correlacionados com os obtidos pela metodologia CLAE apresentando um coeficiente de correlação igual a 0,966. Submetendo os resultados médios ao teste de Tuckey confirmou-se que há diferenças significativas entre os diferentes períodos analisados, como pode ser observado na Tabela 4. No entanto, as diferenças observadas mostraram-se mais nítidas para a CLAE do que para a ninidrina ácida.

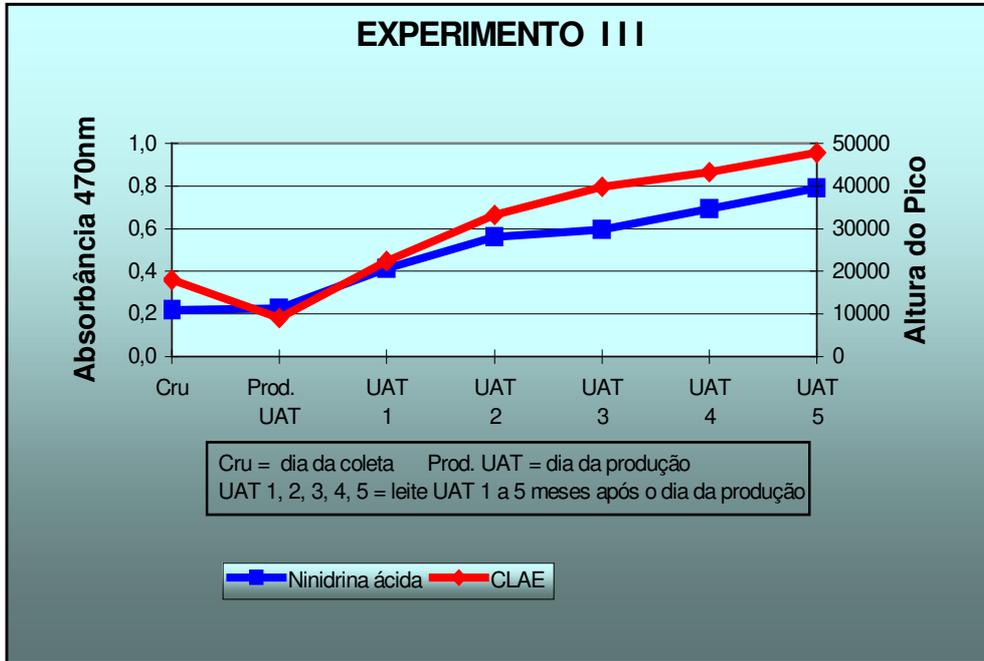
a)



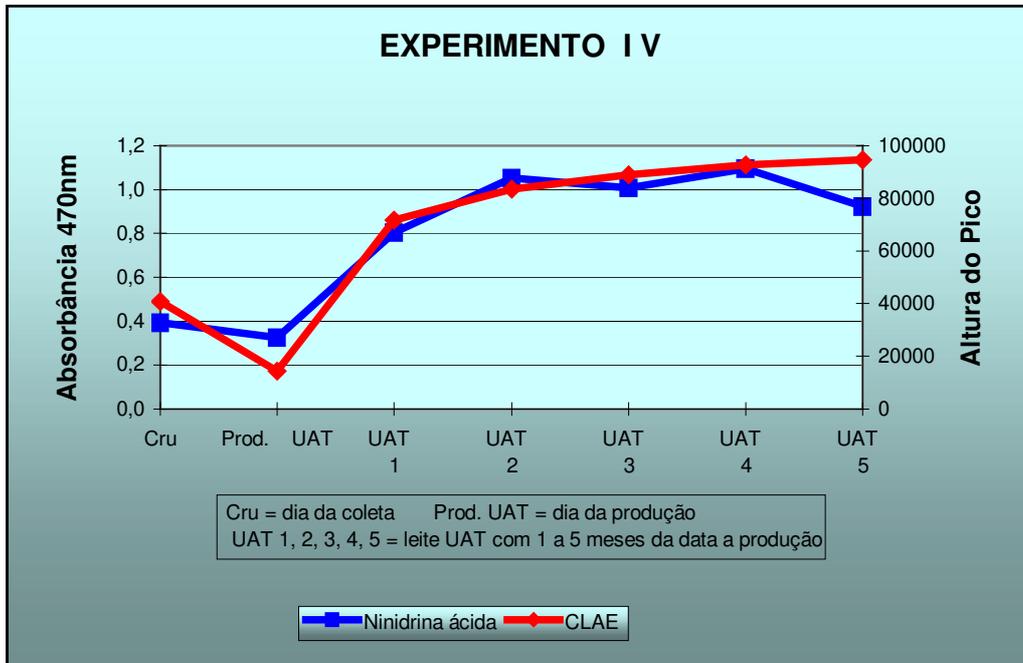
b)



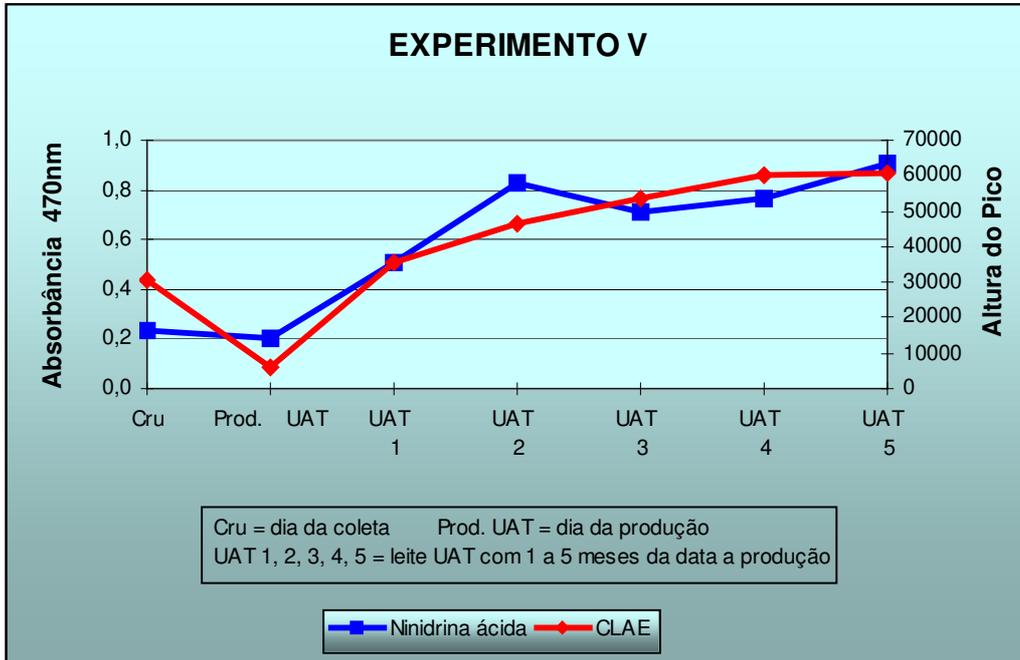
c)



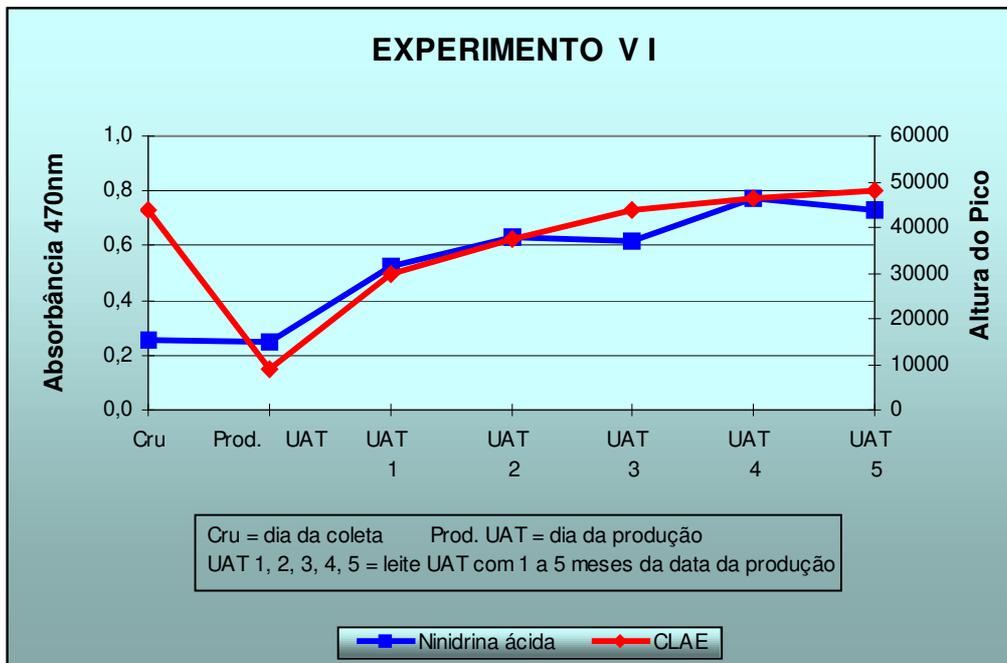
d)



e)



f)



g)

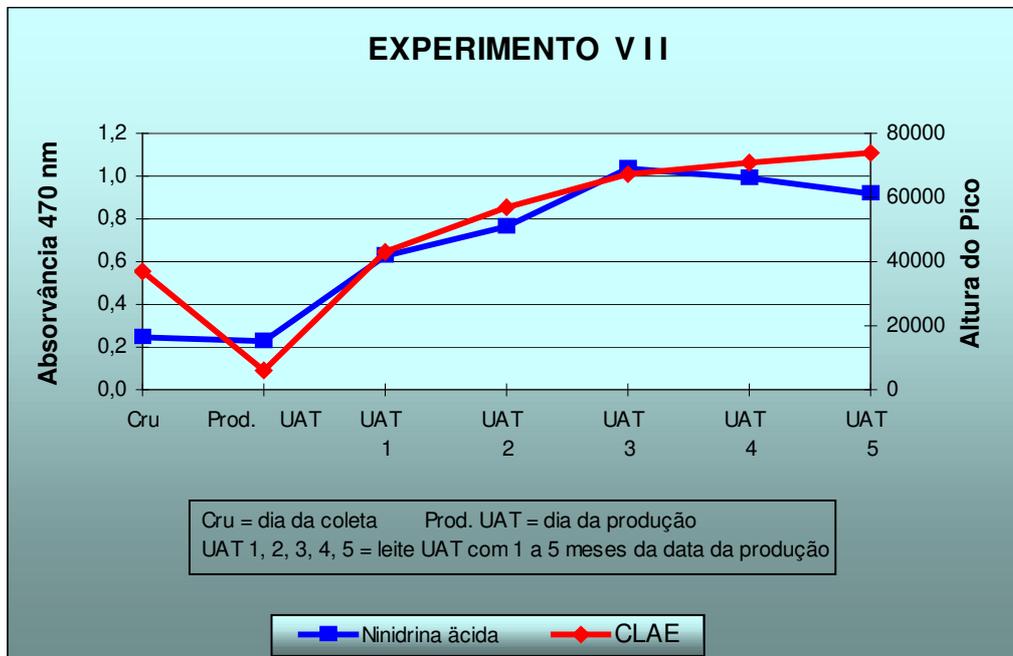


Figura 1 – a, b, c, d, e, f, g - Comparação dos resultados dos experimentos I a VII obtidos pelas metodologias da ninidrina ácida e do CLAE para leite cru e UAT no dia da produção e pelo prazo de vida comercial correspondentes.

Tabela 4. Evolução dos resultados (médias e desvios) das provas de ninidrina ácida e CLAE, com significância determinada pelo teste de Tuckey a 5%, de leite UAT.

Metodologia	Tempo de Estocagem	Média	Desvio Padrão	Significância*
Ninidrina Ácida	Dia da Produção	0,247	0,389	A
	1 mês	0,521	0,201	B
	2 meses	0,754	0,224	C
	3 meses	0,784	0,224	C
	4 meses	0,846	0,206	D
	5 meses	0,868	0,168	D
CLAE	Dia da Produção	8.857	3.179	A
	1 mês	38.596	18.491	B
	2 meses	50.391	20.965	C
	3 meses	57.752	31.671	D
	4 meses	61.875	22.906	E
	5 meses	64.385	22.358	F

* Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de probabilidade.

A boa correlação verificada entre os métodos, confirma a possibilidade de aplicação na rotina do método da ninidrina ácida para a avaliação de proteólise, da mesma forma que o método CLAE foi recomendado por vários autores (OLIEMAN & BEDEN, 1983; MOTTAR et al.,1985; ZALAZAR et al., 1993 e NAKANO & OZIMEK,1999).

4. CONCLUSÕES

A análise dos resultados expostos permite concluir que:

1. Os métodos da ninidrina ácida e da cromatografia líquida de alta eficiência foram capazes de monitorar a evolução proteolítica no leite UAT;
2. Os dois métodos estudados apresentaram bom coeficiente de correlação (0,966) possibilitando seu emprego alternativo;
3. A proteólise foi progressiva durante o período de validade, mesmo partindo de leite cru de diferentes e que já apresentavam teores de GMP/CMP e teor de ácido siálico/GMP acima dos sugeridos como limite por Mottar (1985) e Fukuda et al. (1996);

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENGTSSON, K.; GARDHAGE, L.; ISAKSSON, B.; Gelations in UAT treated milk, whey and casein solution. The effect of heat resistance proteases. **Milchwissenschaft**, v. 28, n. 8, p. 495-499, 1973.

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. 26245-26246.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária n. 22, 14 abr. 2003. Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 02 mai. 2003, p.3-25.

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

FUKUDA, S.P.; RÖIG, S.M .; PRATA, L. F. Metodologia quantitativa para determinação espectofotométrica de ácido siálico no leite. **Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios**, p. 114-120, Juiz de Fora / MG, 1994.

FUKUDA, S. P.; RÖIG, S. M .; PRATA, L. F. Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para detecção da adição de soro ao leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SBCTA, v. 16, n. 1, p. 52-56, 1996.

FUKUDA, S. P.; RÖIG, S. M .; PRATA, L. F. Correlação da metodologia da ninidrina ácida com a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE para avaliação da adição de soro ao leite. **Le Lait** (dados em fase de publicação).

LAW, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research** , v. 46, p. 573-588, 1979.

MOTTAR, J.; Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UAT. **Lait**, v. 64, n. 635-636-637, p. 29-45, 1984.

MOTTAR, J.; RENTERGHEM, R. van; VILDER, J. Evaluation of the raw material for UAT milk by determining the degree of protein breakdown through HPLC. **Milkwissenschaft**, v. 40, n. 12, p. 717-721, 1985.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Determination of sialic acid by the thiobarbituric acid reaction in sweet whey and its fractions. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2613-2616, Jul. 1999.

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 Dairy Journal**, v. 37, p. 27-36, 1983.

RECIO, I.; FRUTOS, M.; OLANO, A; RAMOS, M. Protein changes in stored ultra-high-temperature-treated milks studied by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 3955-3959, Dec. 1996.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO,R; Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

ROWE, M.T.; DUNSTALL, G.; KILPATRICK, D.; WISDOM, G.B. A study of changes in the psychrotrophic microflora of raw milk during refrigerated storage. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 5, p. 247-250, 2001

VILDER, J.; RENTERGHEM, R. van; WAES, G. Determination of rennet whey in sour cream and buttermilk. **Milchwissenschaft**, v. 43, n. 7, p. 426-429, 1988.

ZALAZAR, C.A.; MEINARDI, C.A.; PALMA, S.; SUAREZ, V. B.; REINHEIMER, J. A. Increase in soluble sialic acid during bacterial growth in milk . **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 48, p.1-4, May, 1993.

Este capítulo foi encaminhado para publicação na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos da SBCTA. (Recebido pela revista em 11/09/03).

CAPÍTULO I V

**EFEITO DO CONGELAMENTO DE AMOSTRAS DE LEITE
PARA A REALIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA E DO MÉTODO DE NINIDRINA ÁCIDA NA
PESQUISA DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE SORO**

EFEITO DO CONGELAMENTO DE AMOSTRAS DE LEITE PARA A REALIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DO MÉTODO DE NINIDRINA ÁCIDA NA PESQUISA DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE SORO

RESUMO

No Brasil, as amostras de leite remetidas para análises de cromatografia líquida de alta eficiência, para detecção de fraude por adição de soro, são congeladas logo após a colheita. O objetivo do trabalho foi estudar o efeito do congelamento em leite cru e UAT correspondente e possível influência deste processo nos valores de CMP e ácido siálico/GMP obtidos pelas metodologias de CLAE e da ninidrina ácida, respectivamente. Houve um aumento dos valores obtidos entre o leite cru sem congelar e o congelado por 1 dia, com tendência a diminuir quando a estocagem congelada foi estendida. Para o leite UAT a tendência foi de queda suave e contínua.

PALAVRAS-CHAVE: Leite. Congelamento. CLAE. Ninidrina Ácida.

SUMMARY

Milk samples, in Brazil, are forwarded for high pressure liquid chromatography analytical purposes, frozen soon after collection. This research had the objective of to study the influence of freezing on samples of raw and corresponding UAT milk on the values of CMP and sialic acid/GMP obtained by the CLAE and acidic ninhydrin respectively. It was obtained a increase among the values for one day frozen milk with respect to raw milk, and a tendency to decrease when frozen storage was extended. UAT milk presented a mild continuous decrease trend.

KEY-WORDS: Milk. Frozen. HPLC. Ninhydrin acid.

1. INTRODUÇÃO

Os serviços de fiscalização de produtos de origem animal no Brasil, seja federal ou estadual, tem como procedimento usual a remessa de amostras de leite congeladas logo após a colheita, para a pesquisa de soro através do método de cromatografia líquida de alta eficiência. O congelamento das amostras faz-se necessário para impedir a ocorrência de uma possível proteólise e, dessa maneira, levar a um resultado duvidoso ou até mesmo falso-positivo, além de permitir sua conservação por períodos variáveis até a execução de suas análises, principalmente em se tratando das dimensões continentais brasileiras.

O congelamento de leite pode causar alterações nas suas propriedades. A completa geleificação no descongelamento raramente ocorre, mas sua aparência não permanece homogênea e, algumas vezes, exibe sedimentação, floculação ou liberação de óleo (TULLOCH & CHENEY, 1984). Quando estocado congelado, o complexo fosfocaseinato de cálcio é afetado e, com o tempo, há perda da estabilidade, aparecendo um precipitado quando o leite é descongelado. Inicialmente, a floculação é reversível com aquecimento e agitação, posteriormente, com a continuação da estocagem, torna-se irreversível (KEENEY & KROGER, 1974).

Muitas variáveis composicionais e de processamento afetam a estabilidade da micela de caseína em leite concentrado congelado. Estes fatores incluem a fração caseína, o pH, a composição mineral, o teor de sólidos totais, o teor de gordura, a homogeneização, temperaturas de pré-aquecimento ou pasteurização excedendo 77°C, o grau de concentração, resfriamento e/ou manutenção do produto sob refrigeração entre a concentração e o congelamento, a velocidade de congelamento, a cristalização da lactose, temperaturas de estocagem, principalmente abaixo de -23,3°C e acima de -17,8°C, a flutuação dessa temperatura e a dilatação do período de estocagem (KEENEY & KROGER, 1974; MORR, 1975; WONG, 1988; KOSCHAK et al., 1981).

Tem sido documentado que temperatura abaixo de -9°C resulta em melhoria da estabilidade protéica. Leite congelado e estocado em temperatura abaixo de -20°C permanece estável por longo tempo, sendo que essa estabilidade

diminui acentuadamente em temperatura acima de -20°C . Entretanto, os detalhes de como a estabilidade das proteínas do leite e do leite concentrado variam na faixa de 0 a -20°C são escassos (KOSCHAK, et al., 1981).

A estabilidade da proteína melhora com os procedimentos de resfriamento e congelamento rápidos. A desestabilização, associada ao resfriamento e congelamento lentos, pode ser causada pela formação de grandes cristais de gelo, cristalização da lactose e desnaturação da proteína pelo frio. A estocagem de leite concentrado congelado rapidamente (15 minutos) pode ser estendida para 24 semanas (JOHNSON, 1971). Entretanto, Koschak et al. (1981), trabalhando com amostras de leite integral, normal e concentrado (3X), pré-aquecidas e congeladas rápida ou lentamente a -20 ou -78°C e, então, estocadas por períodos maiores que 4 semanas a -8°C , observaram que para o grau de concentração estudado, independente da temperatura máxima, o congelamento lento resultou em maior estabilidade protéica do que o congelamento rápido. Para todas as amostras congeladas lentamente a estocagem foi, aproximadamente, o dobro daquelas congeladas rapidamente.

O congelamento e estocagem do leite a -10°C causam cristalização da água pura, enquanto que o líquido não congelado torna-se mais saturado em relação aos vários sais. A força iônica da fase líquida aumenta com um concomitante aumento na concentração de Ca^{2+} , pois parte do fosfato de cálcio solúvel precipita-se como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, liberando H^+ e diminuindo o pH até 5,8 aproximadamente. A cristalização da lactose como α -monohidratada exacerba a situação. A combinação do aumento da concentração de Ca^{2+} e a redução do pH causam desestabilização das micelas que precipitam quando o leite é descongelado (FOX & McSWEENEY, 1998).

A estabilidade física do sistema micelar da caseína está fortemente relacionada com o grau de cristalização da lactose da fase não congelada. Essa cristalização aumenta temporariamente o ponto de congelamento da solução, levando a um aumento da concentração e promovendo a desestabilização da micela de caseína (WONG, 1988). Enquanto a lactose permanecer em estado amorfo, a caseína geralmente mantém sua estabilidade, porém a cristalização da

lactose desencadeia sua rápida agregação. Por isso, é importante congelar rapidamente e manter a temperatura abaixo de -20°C (WALSTRA & JENNESS, 1984).

O teor de sais no leite é maior do que pode ser mantido em solução, isto é, o excesso desses sais não está em solução verdadeira, mas em estado coloidal, mantendo-se em equilíbrio com os sais dissolvidos. Tratamentos, como a estocagem congelada e o aquecimento, causam uma mudança do equilíbrio salino do leite, sugerindo que a interação entre o fosfato tricálcico precipitado e as micelas de caseína deva ser a responsável pela instabilidade (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

Usando ultrafiltração, Wells & Leeder (1963) mostraram que a desestabilização da caseína, durante a estocagem congelada, foi acompanhada pela perda de cálcio solúvel, fosfato e citrato. A união cálcio-fosfato formada durante o congelamento é diferente, nesse caso, daquela apresentada na micela de caseína nativa de um leite estável (CHEN & YAMAUCHI, 1971),

Koschak et al. (1981) usaram dois procedimentos para descongelamento e avaliação da estabilidade protéica. Primeiramente, amostras de leite congelado foram descongeladas por 3 horas em banho-maria a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Antes da medida de viscosidade, as amostras foram suavemente homogeneizadas por 45 vezes. No segundo, amostras foram descongeladas por 24 horas a 4°C e agitadas lentamente por 5 minutos em agitador de velocidade variável operando a 100rpm. Quanto à viscosidade e índice de solubilidade, o leite integral normal (12% de sólidos totais) foi o menos estável a -8°C e o mais estável a 0, -2 e -20°C . Quando o índice de solubilidade excedia 1,0ml/50ml de leite indicava instabilidade, ficando evidente que a temperatura de estocagem entre -4 e -12°C era especialmente indesejável. Quanto à aparência visual, amostras a -8°C tornaram-se inaceitáveis em 2 semanas, ao passo que amostras a 0 e -20°C mantiveram-se com aparência aceitável durante 12 semanas de estocagem.

Tulloch & Cheney (1984) congelaram amostras de leite a -10 e -18°C , armazenando-as por dois meses. Após esse período, foram descongeladas em refrigerador entre 2 e 4°C e julgadas quanto aos caracteres organolépticos:

aparência, flavour e precipitação de proteína. A extensão da floculação ou precipitação de proteína foi determinada pelo derramamento do leite para um béquer de vidro, observando-se a aderência de algum material nas laterais. De 63 amostras congeladas a -10°C , 7 e 11 apresentaram, respectivamente, ligeira e excessiva precipitação. Das 61 amostras congeladas a -18°C , 14 apresentaram ligeira precipitação e somente 2 tiveram excesso de floculação.

Chen & Yamauchi (1969) trabalharam com leite desnatado pasteurizado (63°C por 30 minutos), resfriado entre $20-25^{\circ}\text{C}$, deixado de um dia para outro em câmara fria a 5°C e, então, estocado a -7°C , por diferentes períodos, variando de 15 a 180 dias. Amostras foram colhidas a intervalos e descongeladas em banho-maria a 37°C . Após serem descongeladas, foram armazenadas em câmara fria (5°C) por 30 minutos para estabilizar a temperatura, só então procedendo à primeira ultrafiltração. Foi observado que o teor de cálcio total ultrafiltrado mostrou uma queda maior nos primeiros quinze dias, continuou a diminuir até próximo dos 120 dias e manteve-se constante, com tendência a aumentar por volta dos 180 dias.

O efeito da agitação sobre o cálcio e fosfato ultrafiltrados, assim como na estabilidade da caseína, demonstraram que grande parte do cálcio total e fosfato inorgânico insolubilizados foi revertida para forma ultrafiltrada pela agitação no início da estocagem. A desestabilização da caseína no período inicial também foi revertida para forma estável. Posteriormente, especialmente entre 120 e 150 dias, o fosfato inorgânico ultrafiltrado insolubilizado reverteu firmemente durante a agitação. A instabilidade da caseína diminuiu com o progresso da estocagem congelada, sendo que nenhuma precipitação ocorreu após os 150 dias (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

A estocagem congelada a -7°C por 15 e 30 dias causou marcante aumento na viscosidade do leite desnatado, mas se aproximou do valor do leite não congelado quando após o descongelamento se efetuou agitação por 48 h do leite estocado por 15 dias. Na estocagem por 30 dias também ocorreu uma reversão parcial na viscosidade pela agitação. Comparando os dados da viscosidade com os da estabilidade da caseína uma tendência diferente pode ser apontada. A

desestabilização da caseína por 15 ou 30 dias de estocagem reverteu-se quase completamente durante as primeiras 24 horas de agitação, enquanto que a reversão foi somente parcial para a viscosidade. No teste de estabilidade, apenas floculação grosseira foi separada (centrifugação), estimando-se que seja facilmente desagregada para partículas não sedimentáveis durante a agitação, mas ainda com grande tamanho quando comparadas às micelas de caseína nativas, contribuindo para o aumento da viscosidade (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

Parece que a interação do cálcio iônico com as micelas de caseína é a principal responsável pela formação do floculado redispersável no estágio inicial do congelamento. Talvez a estrutura da micela de caseína não seja drasticamente modificada e a interação do cálcio possa ser revertida pela agitação. A incorporação do fósforo inorgânico parece estar relacionada com a formação do precipitado caseíco, que é redispersado por agitação (CHEN & YAMAUCHI, 1969). Fox et al. (1965) sugeriram que o fosfato poderia penetrar na micela de caseína e modificar sua estrutura, com formação de um complexo de precipitação grosseira. O prolongamento do tempo de estocagem, mais que 150 dias, causou um ligeiro aumento do cálcio iônico, citrato ultrafiltrado e caseína não sedimentável, indicando que certos componentes da caseína liberaram-se para formas solúveis. Isso sugere que possa haver uma degradação parcial do complexo caseinato desestabilizado quando o congelamento é estendido (CHEN & YAMAUCHI, 1969).

Ao analisar resultados de 24 amostras de leite, Tulloch & Cheney (1984) observaram que não houve relação aparente entre a contagem bacteriana do leite pasteurizado e a avaliação organoléptica após congelamento e descongelamento. As contagens mais altas foram classificadas como boas em todos os caracteres organolépticos após estocagem a -18 e -10°C , enquanto alguns leites com contagens baixas apresentaram problemas. Somente duas contagens padrão de placas excederam $5,0 \times 10^4$ ufc/ml, cuja média foi $1,8 \times 10^4$ ufc/ml e somente três amostras mostraram contagens de psicotróficos maiores que $2,0 \times 10^3$ ufc/ml. Em outro experimento, demonstraram que 33 das 61 amostras de leite pasteurizado, congelado e armazenado por 2 meses sob condições ideais a -18°C , apresentaram visíveis defeitos quando descongeladas. Quando estocadas a -10°C ,

os problemas foram maiores em número e intensidade. Para Koschak et al. (1981), a alta viscosidade que se desenvolveu em amostras estocadas por 12 semanas a 0°C poderia ter sido o resultado do crescimento bacteriano, uma vez que as contagens (total e de psicotróficos) em amostras estocadas a 0 e -2°C foram notadamente maiores do que naquelas estocadas em temperatura mais baixa, sugerindo ser improvável que o crescimento bacteriano tenha influenciado significativamente os resultados para temperatura abaixo de -2°C.

Koschak et al. (1981) observaram que a desestabilização da caseína, quando avaliada em amostras descongeladas de leite e leite concentrado, foi detectável precocemente pelas alterações na aparência visual mais do que as modificações na viscosidade ou índice de solubilidade. A estabilidade da proteína, da maioria das amostras, determinada pelo índice de solubilidade, viscosidade e aparência, tendeu a diminuir não linearmente quando a temperatura de estocagem ficou abaixo do ponto de congelamento, não melhorando até que temperatura abaixo de -12°C fosse utilizada.

Por outro lado, é sabido que em leite estocado a baixas temperaturas, a β -caseína se dissocia da micela e a quantidade de caseína solúvel pode aumentar em até 30%, sugerindo que a refrigeração pode fazer com que as frações de caseína se tornem mais suscetíveis à proteólise (CROMIE, 1992). O uso de refrigeração tem sido adotado em todos os níveis de processamento do leite. A adaptação de tanques isotérmicos na fazenda permite estocar o leite por várias ordenhas (GARG, 1990) e o leite à temperaturas de 4-6°C, estocado por 48h, permite o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos, sendo eles responsáveis pela formação de enzimas termorresistentes (MOTTAR, 1984).

Além disso, uma das fases preliminares para o isolamento das frações para análise da fraude por adição de soro de queijo ao leite é a desproteínização do leite com soluções de TCA, um desproteínizante enérgico, cuja ação sobre leite em diferentes condições de estabilidade ainda se desconhece, e por não existirem informações do efeito do congelamento e nem tampouco padronização de procedimentos de descongelamento de amostras de leite congelado para esta finalidade teve-se por objetivo neste trabalho avaliar o comportamento do leite quando

congelado e se, de alguma maneira, esse procedimento interfere ou não nos resultados tanto da pesquisa do CLAE como do método da ninidrina ácida na avaliação do teor de CMP/GMP/Ácido siálico.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram organizados três experimentos com leite de procedências diferentes. Em cada experimento, trabalhou-se com leite UAT e o leite cru resfriado que lhe deu origem. No caso de leite cru resfriado, considerou-se, como ponto de partida, o dia da coleta no laticínio e, para o leite UAT, o dia da produção.

Amostras do leite cru resfriado e do leite UAT correspondente foram congeladas e mantidas por 24 horas (1dia) e 1 mês, em temperaturas de -14 a -18°C, em freezer doméstico. Após esses prazos de estocagem, as amostras foram levadas ao banho-maria a $\pm 40^{\circ}\text{C}$ até total descongelamento e, então, invertidas 25 vezes, para sua completa homogeneização, antes da realização das análises. As amostras de leite cru e UAT do dia da produção e as congeladas por um dia, para as análises de CLAE, foram estocadas e transportadas na forma de filtrado de TCA.

Todas as amostras foram submetidas, em duplicatas, ao teste de ninidrina ácida, para a quantificação de ácido siálico (GMP livre), e da cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, para a detecção de glicomacropéptido/caseinomacropéptido – GMP/CMP, objetivando a comparação do comportamento dos respectivos resultados.

2.1. – METODOLOGIA ANALÍTICA

2.1.1 - Método da ninidrina ácida:

A cada 10 ml de leite acrescentou-se, sob agitação, 10ml de ácido tricloroacético – TCA a 24% (m/v). Após homogeneização e repouso por 30 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro (Whatman n.º 40). Tomou-se 10ml do filtrado desproteínizado, colocou-os em tubos de centrífuga (não cônicos) e

adicionou-se 1ml de ácido fosfotúngstico a 20% (m/v). Seguiu-se centrifugação a 3.500rpm por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e dispersou-se o sedimento com 6ml de álcool etílico 95% (v/v). Procedeu-se à nova centrifugação por 10 minutos. Desprezou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se, ao resíduo, 2ml de ácido acético glacial p.a. e 1ml do reagente de ninidrina ácida (1g de ninidrina, 16ml de ácido clorídrico p.a. e 24ml de ácido acético glacial p.a.). Após homogeneização, submeteu-se a mistura ao banho-maria fervente por exatos 10 minutos. Houve desenvolvimento de cor variando do amarelo ao marron-amarelado. Resfriou-se a solução em água gelada e logo após submeteu-se a mesma à leitura espectrofotométrica, no comprimento de onda de 470nm, contra branco dos reagentes. As leituras foram transformadas em concentração de ácido siálico ($\mu\text{g/ml}$ de leite) por comparação a uma curva padrão construída com ácido siálico (Type IV 95% Sintetic – Sigma Chemical CO.) (FUKUDA, 1994; FUKUDA et al., 1994). Para a técnica descrita, a diluição final de TCA foi de 12%.

Para se obter a concentração final de 8% misturou-se 20ml de leite e 10ml de TCA 24% (m/v) e para a de 10% tomou-se 14ml de leite e 10ml de TCA 24% (m/v), sendo os demais procedimentos iguais aos descritos acima.

2.1.2 - Método CLAE:

Adotou-se a metodologia oficial do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1991). A 10 ml de leite fluido gotejou-se, sob agitação constante, 5ml de TCA 24% (m/v). Deixou-se em repouso por 60 minutos e filtrou-se (papel de filtro Whatman 40), descartando as primeiras gotas do filtrado. Submeteu-se 15-30 μl do filtrado à corrida cromatográfica em aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência, com injetor manual e “looping” de 100 μl , coluna Zorbax GF com 9,4mm de diâmetro interno por 25cm de comprimento, Bio Series da Du Pont e integrador-registrador. A vazão foi de 1ml por minuto e a detecção ocorreu na faixa do UV-VIS, no comprimento de onda de 205nm. A fase estacionária da coluna era constituída por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio

estabilizado. A fase ligada era uma monocamada molecular hidrofílica com diâmetro de poro de 150A^o. A fase móvel usada na separação foi um padrão fosfato de pH 6 (1,74g de fosfato monoácido de potássio (K₂HPO₄) p.a., 12,37g de fosfato ácido de potássio (KH₂PO₄) p.a. e 21,41g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) dissolvidos em, aproximadamente, 700ml de água bidionizada. Ajustou-se o pH da solução para 6, usando solução de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1N ou solução de hidróxido de sódio (KOH) 50% (m/v). Completou-se o volume para 1000ml com água bidionizada. Essa solução foi filtrada em membrana de 0,45µm e degaseificada. A curva padrão foi elaborada utilizando leite de procedência conhecida e o mesmo leite adicionado de 5%, 10%, 15% e 20% de soro de queijo, conforme recomendado pela metodologia oficial. Construiu-se um gráfico de porcentagem de soro versus a intensidade do sinal do detector (altura do pico), calculando-se a equação da reta de regressão, aceitando valores de $r \geq 0.95$. Comparando-se o cromatograma da amostra com o leite adicionado de soro, identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do soro. A porcentagem de soro na amostra foi calculada por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de soro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às amostras de leite cru resfriado estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características do leite cru quando do seu recebimento na planta beneficiadora de leite UAT.

Experimentos	Procedência do Leite	Tempo de Viagem	Temperatura de Chegada	Crioscopia ¹
I	A	4h *	5°C	-0,535 ^o H
	B	5h5min *	5°C	-0,535 ^o H
II	C	---*	---	---
III	D (Região)	3h	6°C	-0,534 ^o H

* Tempo transcorrido entre a origem e o descarregamento na planta beneficiado.

¹ Média do índice crioscópio dos compartimentos do caminhão-tanque.

Os resultados dos três experimentos obtidos pelas duas metodologias citadas para leite cru original e seu correspondente leite UAT, nas condições normais e após congelamento pelo período de 1 dia e 1 mês, estão mostrados na Tabela 2.

As amostras de leite cru resfriado diferem entre si, pois são de origens diferentes e com tempo de viagens distintos podendo-se supor que suas condições higiênicas eram desiguais, no momento da coleta, o que pode ser percebido pelos resultados das duas metodologias.

No entanto, todas as amostras se comportaram similarmente frente ao congelamento de 24 horas, isto é, houve um acréscimo significativo, pelas duas metodologias, tanto no teor de GMP (medido indiretamente pelo ácido siálico) como na altura do pico de GMP/CMP do cromatograma. A média desta variação para as absorvâncias foi de 33.1%, enquanto para as alturas dos picos do foi de 68,1%.

Após as amostras de leite cru terem sido submetidas a um congelamento por um período de 1 mês, os teores detectados aproximaram-se daqueles obtidos pelo leite que não sofreu congelamento, exceção feita à amostra do experimento II. Entretanto, em relação aos dados do leite congelado por 1 dia, houve uma diminuição geral em todos os resultados.

Quando essas amostras foram submetidas ao processo de ultrapasteurização e analisadas no dia de produção, houve uma diminuição dos valores ($\pm 10\%$), em relação aos originais, valores estes que continuaram em decréscimo suave após congelamento por 24 horas e 1 mês, para ambas as metodologias. A queda dos valores de GMP/ CMP sempre foi detectada entre matéria-prima e produto recém-processado, sejam UAT ou pasteurizado, o que já foi evidenciado na prática, com leite pasteurizado por Fukuda (1994).

Comparando-se os valores do leite UAT congelado por 1 mês com o leite cru que lhe deu origem, pode-se perceber a tendência de queda, ao redor de 20%, para as duas metodologias.

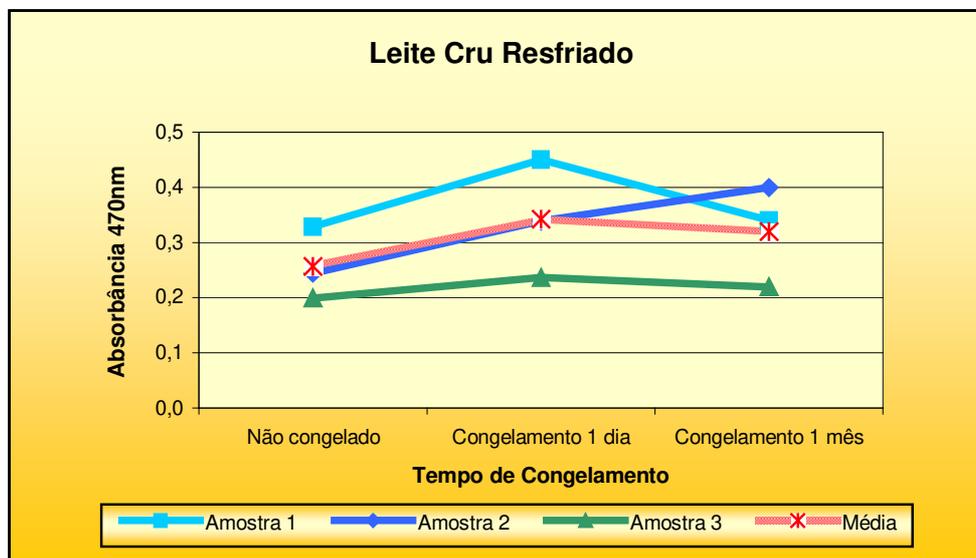
Ao se plotar os dados dos três experimentos (Figura 1, 2, 3 e 4), pode-se verificar uma tendência do comportamento do leite ao ser congelado e descongelado, dada pela média de todos os resultados.

Tabela 2 - Valores encontrados pelo método da ninirina ácida (em absorvância a 470 nm) e CLAE (altura do pico) em análises realizadas em amostras de leites antes e após processamento por ultra alta pasteurização (UAT pelo método de injeção de vapor) e após congelamento por 24 horas e 1 mês

Tipo de Leite	Condição da Amostra	E X P E R I M E N T O S							
		I		II		III		Média	
		Ninidrina	CLAE*	Ninidrina	CLAE*	Ninidrina	CLAE*	Ninidrina	CLAE*
		Ácida*		Ácida*		Ácida*		Ácida*	
		A _{470 nm}	Alt. Pico	A _{470 nm}	Alt. Pico	A _{470 nm}	Alt. Pico	A _{470 nm}	Alt. Pico
Leite Cru Resfriado	Dia da Coleta	0,329	18.275	0,244	8.725	0.199	2.673	0,257	9.741
	Congelada - 24 horas	0,450	23.354	0,339	19.170	0.236	6.610	0,342	16.378
	Congelada - 1 mês	0,340	18.777	0,400	9.833	0.220	5.535	0,320	11.382
Leite UAT	Dia da Produção	0,291	16.473	0,246	7.496	0,173	2.430	0,237	8.800
	Congelada - 24 horas	0,321	14.062	0,217	5.869	0,150	1.982	0,229	7.304
	Congelada - 1 mês	0,238	13.557	0,211	6.329	0,153	1.908	0,201	7.265

* Média de duplicatas

a)



b)

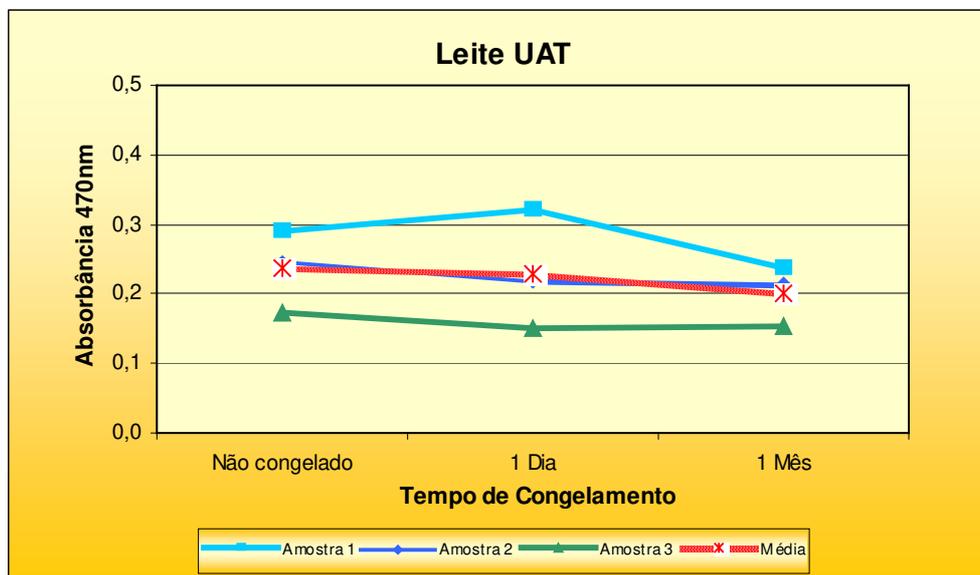
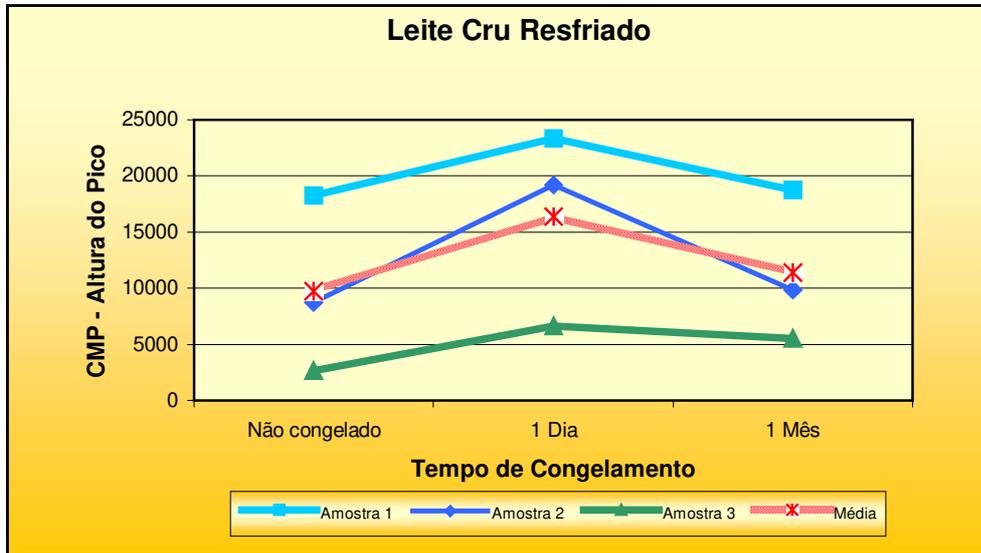


Figura 1 – Variação da absorbância na pesquisa do teor de ácido siálico detectada pelo método da ninidrina ácida em leite submetido ao processo de congelamento; **a:** leite cru, **b:** leite UAT.

a)



b)

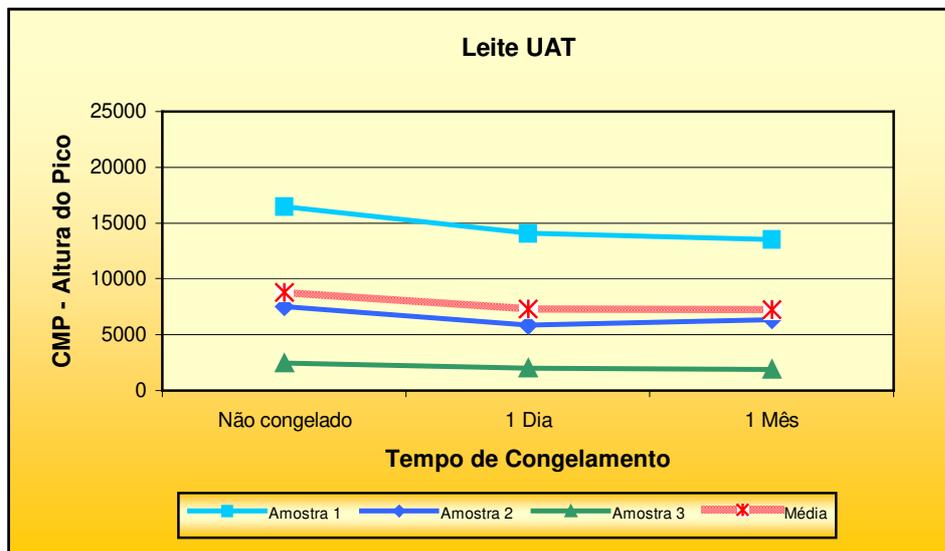


Figura 2 – Variação da altura do pico do CMP detectado pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência em leite submetido ao processo de congelamento; **a:** leite cru, **b:** leite UAT.

Nas Figuras 1a e 2a, correspondentes ao comportamento do leite cru congelado em relação ao do leite em condições normais, pode-se observar uma tendência semelhante em ambas as metodologias, que variaram como já afirmado por Fukuda et al. (dados em publicação). As amostras de leite cru dos 3 experimentos apresentaram-se bastante diferentes quanto ao teor de ácido siálico e altura do pico. Num primeiro momento, após o congelamento por 1 dia, há um acréscimo acentuado das variáveis pesquisadas, para no congelamento por 1 mês ocorrer uma queda significativa, levando a curva a pontos muito próximos ou ligeiramente superiores aos da matéria-prima não congelada. A amostra 2 não apresentou essa diminuição, continuando a acusar um aumento de ácido siálico. As variações ocorridas nos diferentes pontos de congelamento foram mais pronunciadas na cromatografia.

Essa mudança da estabilidade do leite cru frente ao congelamento, talvez pudesse ser explicada pela qualidade da matéria-prima e também pela falta de proteção do leite, que é processado vários dias após a sua obtenção, sofrendo resfriamento na fazenda por 48/72 horas, dando oportunidade ao crescimento da microbiota psicrotrofica. Esses fatores irão se somar ao desequilíbrio salino e protéico que normalmente ocorrerá pelo processo de congelamento. No entanto, como nesses experimentos o leite foi congelado antes de ser submetido às duas metodologias, a correspondência entre os valores obtidos foi regular ($r=0.849$).

Por outro lado, o leite UAT (Figuras 1b e 2b) apresenta uma queda suave, mas contínua, entre as três fases do teste, para as duas metodologias. Essa queda apresenta-se um pouco mais significativa quando se compara os valores finais (congelamento por 1 mês) com os iniciais do leite cru resfriado não congelado.

Toda a literatura revisada à respeito da instabilidade protéica provocada pela estocagem congelada de leite, discorre sobre o desequilíbrio salino afetando a solubilidade das proteínas e sua conseqüente floculação e precipitação, porém esse processo é passível de reversão, com descongelamento e agitação

adequados. No entanto, nenhum autor se refere à ocorrência do processo de proteólise.

4 - CONCLUSÃO

Os dados apresentados sugerem que o congelamento das amostras pode afetar os resultados do teor de CMP/GMP por qualquer um dos métodos estudados. Assim, o ideal seria que as determinações de GMP/CMP fossem feitas de imediato com amostras recém colhidas não congeladas. Neste caso o método da ninidrina ácida apresenta-se como o mais indicado em virtude da sua facilidade de execução em qualquer laboratório de análises físico-químicas, ao contrário do método CLAE que ainda hoje é realizado em número reduzido de laboratórios.

Sugere-se que a CLAE, consagrada pela literatura, independentemente de continuar sendo aplicada como metodologia de rotina, fosse aquela a ser empregada para os casos duvidosos e/ou em contestação.

No entanto, sugere-se também que, caso haja necessidade, o envio de amostras de leite congeladas seja substituído pelo envio dos filtrados de TCA dessas amostras, pela facilidade de manuseio, transporte e segurança de que o GMP/CMP que está sendo dosado corresponde ao do momento da coleta.

Essa medida, no entanto, requer cuidados com relação à qualificação do pessoal envolvido nesta atividade, bem como na operacionalização de preparo e transporte dos filtrados de TCA das amostras.

Sugere-se finalmente a continuação desta linha de pesquisa com a ampliação do universo amostral e segmentação de variáveis de estudo.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 da Secretaria de Defesa Agropecuária n. 22, 14 abr. 2003. **Oficializa métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da União, 02 mai. 2003, p.3-25.

CHEN, C.-mo; YAMAUCHI, K. Gel filtration of caseins micelles from milk destabilized by frozen storage. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 637-643, 1971.

CHEN, C-mo; YAMAUCHI, K. Change of salt distribution in milk during frozen storage and its partial reversion after thawing. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 1333-1341, 1969.

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

FOX, K.K.; HARPER, M.K.; HOLSINGER, V.H.; PALLANSCH, M.J. Gelation of milk solids by orthophosphate. **Journal Dairy Science**, v. 48, n. 2, p. 179-185, Feb.1965.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Milk proteins. In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**, 3.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998a. caps. 4 e 5, p. 146-264.

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

FUKUDA, S.P.; RÖIG, S.M .; PRATA, L. F. Metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico no leite. **Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios**, p. 114-120, Juiz de Fora / MG, 1994.

GARG, S.K. Psychrotrophs in milk – a review. **Indian Journal of Dairy Science**, v.43, n.3, p.433-440, 1990.

JOHNSON, C.E. Some factors affecting the storage stability of frozen milk concentrate. **Dissertation Abstracts International**, Section B., v. 31, n. 11, p. 6677-6678, 1971.

KEENEY, P.G.; KROGER, M. Frozen dairy products. In: WEBB, B.H. et al. **Fundamentals of dairy chemistry**, 2.ed. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, 1974. cap. 14, p. 873-886.

KOSCHAK, M.S.; FENNEMA, O.; AMUNDSON, C.H.; LEE, J.Y. Protein stability of frozen milk as influenced by storage temperature and ultrafiltration. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 4, p. 1211-1217, 1981.

MORR, C.V. Chemistry of milk proteins in food processing. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 7, p. 977-984, Jul. 1975.

MOTTAR, J.; Influence de la durée de conservation sous réfrigération du lait cru sur la conservabilité du lait UAT. **Lait**, v. 64, n. 635-636-637, p. 29-45, 1984.

TULLOCH, D.; CHENEY, M. Keeping quality of Western Australian frozen milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39, n. 2, p. 85, 1984.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. Propriedades de los concentratos lácteos – Congelación. In: **Química y física lactológica**. 1.ed., Ed. Acribia: Zaragoza. Espanha, 1984. cap. 17. p. 269-300.

WELLS, P. R.; LEEDER, J., G. Changes related to casein precipitation in frozen concentrated milk. **Journal of Dairy Science**, v. 46, p.789-798, 1963.

WONG, N. P.; Chemistry of Processing. In: **Fundamentals of dairy chemistry**, 3.ed. Van Nostrand Reinhold, N.Y., 1988. cap.14, p.739-766.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados encontrados, no presente trabalho, permitem concluir que:

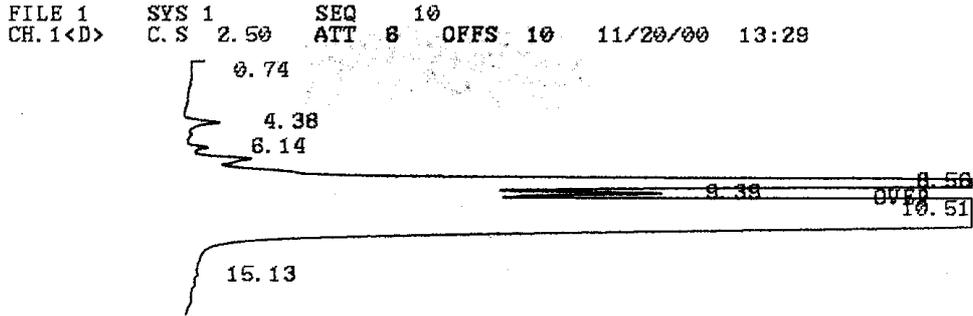
- 1º) O método da ninidrina ácida pode ser considerado tanto como uma metodologia de “screening” quanto uma metodologia substituta para a detecção de adição de soro em leite, deixando a cromatografia líquida de alta eficiência, processo oneroso e que exige mão de obra qualificada, para os casos duvidosos, contra-provas laboratoriais e/ou contestação;
- 2º) Os métodos da ninidrina ácida e da cromatografia líquida de alta eficiência foram capazes de monitorar a evolução proteolítica no leite UAT, apresentando bom coeficiente de correlação (0,966), possibilitando seu emprego alternativo;
- 3º) A proteólise foi progressiva durante o período de validade, mesmo partindo de leite cru de diferentes origens e que já apresentavam teores de GMP/CMP e teor de ácido siálico/GMP acima dos limites citados na literatura por diferentes autores;
- 4º) O congelamento das amostras pode afetar os resultados do teor de CMP/GMP por qualquer um dos métodos estudados. Assim, o ideal seria que as determinações de GMP/CMP fossem feitas de imediato com amostras recém colhidas não congeladas;
- 5º) Sugere-se, também, que o envio de amostras de leite congeladas seja substituído pelo envio dos filtrados de TCA dessas amostras, pela facilidade de manuseio, transporte e segurança de que o GMP/CMP que está sendo dosado corresponde ao do momento da coleta.

- 6º) Essa medida, no entanto, requer cuidados com relação à qualificação do pessoal envolvido nesta atividade, bem como na operacionalização de preparo e transporte dos filtrados de TCA das amostras.

- 7º) Sugere-se, finalmente, a continuação desta linha de pesquisa com a ampliação do universo amostral e segmentação de variáveis de estudo.

ANEXOS

ANEXO A – Cromatograma de Leite Normal - CLAE



D-7500 INTEGRATOR REPORT

ANALYZED: 11/20/00 13:29 REPORTED: 11/20/00 13:48
 SYSTEM : 1
 METHOD : SORO OPERATOR: JOAO
 CHANNEL : 1 <DIGITAL> SEQ : 10

FILE : 1 (11/17/00 10:48) MODULE T-PROG : DETECTOR= 5
 CALC-METHOD: EXT-STD <HEIGHT> COMPONENT TBL : 5 (07/19/00 10:01)

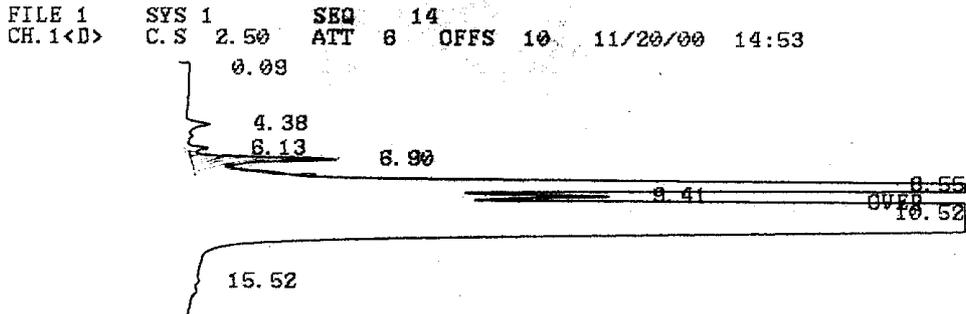
NO.	RT	HEIGHT	%	CONC	BC
5	6.96	4814	0.000	VV	
TOTAL		4814	0.000		
PEAK REJ :		1000			
SF :		1.000			
SAMP-AMT :		1.000			

13%

CONFIDENCE REPORT

DETECTOR : WAVELENGTH ACCURACY = GOOD
 PUMP : PRESSURE PROFILE = 0 spikes

ANEXO C – Cromatograma de Leite adicionado de 5% de soro - CLAE



D-7500 INTEGRATOR REPORT

ANALYZED: 11/20/00 14:53 REPORTED: 11/20/00 15:11
 SYSTEM : 1
 METHOD : SORO OPERATOR: JOAO
 CHANNEL : 1 <DIGITAL> SEQ : 14

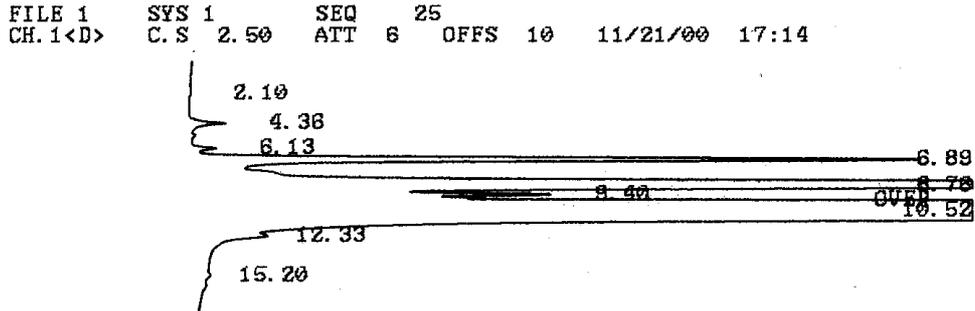
FILE : 1 (11/17/00 10:48) MODULE T-PROG : DETECTOR= 5
 CALC-METHOD: EXT-STD <HEIGHT> COMPONENT TBL : 5 (07/19/00 10:01)

NO.	RT	HEIGHT	%	CONC	BC
5	6.90	10714	0.000	VV	4.3%
TOTAL		10714	0.000		
PEAK REJ :		1000			
SF :		1.000			
SAMP-AMT :		1.000			

CONFIDENCE REPORT

DETECTOR : WAVELENGTH ACCURACY = GOOD
 PUMP : PRESSURE PROFILE = 0 spikes

ANEXO F – Cromatograma de Leite adicionado de 30% de soro - CLAE



D-7500 INTEGRATOR REPORT

ANALYZED: 11/21/00 17:14 REPORTED: 11/21/00 17:33
 SYSTEM : 1
 METHOD : SORO OPERATOR: JOAO
 CHANNEL : 1 <DIGITAL> SEQ : 25

FILE : 1 (11/21/00 10:57) MODULE T-PROG : DETECTOR= 5
 CALC-METHOD: EXT-STD <HEIGHT> COMPONENT TBL : 5 (07/19/00 10:01)

NO.	RT	HEIGHT	%	CONC	BC
5	6.89	52915	0.000	VV	30.4%
TOTAL		52915	0.000		
PEAK REJ :		1000			
SF :		1.000			
SAMP-AMT :		1.000			

CONFIDENCE REPORT
 DETECTOR : WAVELENGTH ACCURACY = GOOD
 PUMP : PRESSURE PROFILE = 0 spikes

RAW DATA STORAGE NO. 19

