UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

# *ESTUDO DE METODOLOGIA QUANTITATIVA PARA DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ÁCIDO SIÁLICO EM LEITE*

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Sandra Pereira Fukuda e aprovada pela Comissão julgadora em 05.08.94

**SANDRA PEREIRA FUKUDA**
**Médica Veterinária**

Salvador Massaguer Roig

**Orientador**
**Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de MESTRE em Tecnologia de Alimentos.**

**1994**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. SALVADOR MASSAGUER ROIG
(Orientador)

Profª. Dra. HELOISA MARCIA CECCHI
(Membro)

Profª. Dra. WALKIRIA H. VIOTTO
(Membro)

Profª. Dra. FLAVIA MARIA NETO
(Membro)

Campinas, 05 de agosto de 1994

Aos meus pais,

pelo afeto e exemplo de perseverança.

Ao Rubens, meu marido,

pelo incentivo, colaboração e acima de tudo

pelo verdadeiro amor.

Aos meus filhos,

Thiago, Frances e Livia,

pela aceitação de tantas horas roubadas.

# Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, pela orientação, ensinamentos e compreensão em todos os momentos;

Ao grande amigo e companheiro de trabalho, Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus de Jaboticabal/SP, pela participação, incentivo e apoio técnico, fundamentais para a realização deste trabalho;

Aos Médicos Veterinários Dr. Francisco Sérgio Ferreira Jardim e Dra. Vera Regina Monteiro de Barros e demais chefias que os sucederam no Serviço de Inspeção de Produto Animal - SERPA/SP, do Ministério da Agricultura em São Paulo, pelo apoio, incentivo e oportunidade concedida para realizar este trabalho;

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP - Campinas/SP, pela oportunidade que me foi concedida;

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Campus de Jaboticabal/SP, por ter permitido o uso de suas instalações para a execução prática dos trabalhos;

Aos Professores Dilermando Perecin e José Carlos Barbosa, do Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Campus de Jaboticabal/SP, pelo assessoramento nos cálculos estatísticos;

À Técnica de Laboratório, Maria Aparecida Dias Tostes Figueira, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Campus de Jaboticabal/SP, pelo carinho, eficiência e dedicação com que participou na execução dos trabalhos laboratoriais;

Aos Agentes de Inspeção Sanitária do Serviço de Inspeção Federal, Jamil, Vera, Rivas, Leila e Renato, pela colaboração nos trabalhos de colheita de amostras;

Às Técnicas de Laboratório, Claudia e Elizabeth, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela atenção e prestatividade dispensadas, sempre que requisitadas;

Às indústrias de laticínios da região de Barretos, pelo fornecimento das amostras e a cessão das suas

instalações para a execução da primeira fase do trabalho;

Às amigas Luciane e Raquel, por todo o apoio e companheirismo demonstrados;

À Rubia, minha cunhada, pelo apoio e incentivo recebidos durante toda minha permanência em Campinas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES , pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que, de alguma maneira me apoiaram, incentivaram e acompanharam durante toda esta difícil e árdua trajetória;

# Índice Geral


| ASSUNTO | PÁGINA |
|---|---|
| ÍNDICE GERAL | I |
| ÍNDICE DE TABELAS | IV |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| RESUMO | V III |
| SUMMARY | X |
| I. INTRODUÇÃO | 01 |
| II. OBJETIVOS | 05 |
| III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 06 |
| 1. PROTEÍNAS DO LEITE | |
| 1.1. Composição e nomenclatura | 06 |
| 1.2. Coagulação enzimática - ação da renina (Quimosina - EC 3.4.23.4) | 11 |
| 1.3. Heterogeneidade e glicosilação da k-caseína... | 14 |
| 2. SORO | |
| 2.1. Obtenção, produção e utilização | 27 |
| 2.2. Detecção de fraude por adição de soro | 29 |
| 2.2.1. Evolução dos métodos | 31 |
| 2.2.2. Metodologia analítica oficial | 49 |

3. PESQUISA DIRETA DE ÁCIDO SIÁLICO EM MATERIAIS BIOLÓGICOS (MÉTODO DA NINIDRINA ÁCIDA) ..... 52
4. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS ..... 55
IV. MATERIAL E MÉTODOS
1. MATERIAIS ..... 59
1.1. Vidrarias, utensílios e outros ..... 59
1.2. Equipamentos ..... 60
1.3. Reagentes ..... 60
2. AMOSTRAS ..... 61
2.1. Acondicionamento ..... 61
2.2. Coleta ..... 62
3. MÉTODOS ..... 64
3.1. Adaptação da técnica de ninidrina ácida ..... 64
3.2. Curva Padrão ..... 65
3.3. Método oficial (Portaria nº 124/MA) ..... 66
3.4. Variáveis estudadas ..... 67
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS ..... 68
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 70
1. ADAPTAÇÃO DO MÉTODO ..... 70
1.1. Definição do protocolo ..... 70
1.2. Estudo de precipitação ..... 78
1.3. Curva Padrão ..... 81
1.4. Parâmetros de precisão ..... 87
1.4.1. Repetibilidade ..... 87

1.4.2. Efeito da adição de soro ..... 91
1.4.3. Sensibilidade ..... 94

2. ESTUDO DE ALGUMAS VARIÁVEIS ..... 96
2.1. Diferenciação entre leites coletados na fazenda e na plataforma industrial ..... 96
2.2. Interferência da pasteurização ..... 98
3. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODO PROPOSTO E MÉTODO OFICIAL ... 100
3.1. Curva Padrão para o método oficial ..... 100
3.2. Comportamento dos métodos ..... 102
3.2.1. Adição de soro ..... 102
3.2.2. Comparação ponto a ponto ..... 105
3.2.3. Comparação geral dos métodos ..... 106
4. DISTRIBUIÇÃO AMOSTRAL ..... 108
4.1. Leite crú autêntico ..... 110
4.2. Leite crú de plataforma ..... 113
4.3. Soro industrial ..... 116
4.4. Proposição de aplicabilidade do método como teste de "screening" em plataformas ..... 117
VI. CONCLUSÕES ..... 126
1. Quanto ao método ..... 126
2. Quanto ao teste de plataforma ..... 127
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 130

# Índice de Tabelas


Tabela 1. Composição média das substâncias nitrogenadas do leite ..... 07

Tabela 2. Composição de aminoácidos do GMP isoladas do soro de queijo em pó e da k-caseína ..... 15

Tabela 3. Composição de carboidratos de 5 oligossacarídeos isolados da k-caseína bovina ..... 20

Tabela 4. Distribuição das unidades de carboidratos ligadas à k-caseína bovina ..... 21

Tabela 5. Efeito do tratamento térmico na concentração de ácido siálico em leite ..... 33

Tabela 6. Interferência da adição de soro no número de caseína ..... 47

Tabela 7. Valores de ácido siálico ..... 48

Tabela 8. Determinação de ácido siálico em leite UHT de acordo com tempo de fabricação ..... 49

Tabela 9. Comparação da utilização de quantidades diferentes de ácido fosfotúngstico 20% em amostras de leite e em misturas de leite e soro ..... 74

Tabela 10. Comparação entre tipos de precipitação ..... 79

Tabela 11. Quadro Demonstrativo da construção da curva padrão para o método da ninidrina ácida ..... 81

Tabela 12. Leitura espectrofotométrica a 470 nm dos padrões e respectivas médias ..... 82

Tabela 13. Teste de repetibilidade do método da ninidrina ácida para duplicatas ..... 89

Tabela 14. Teste de repetibilidade do método da ninidrina ácida para quadruplicatas ..... 90

Tabela 15. Resposta do método da ninidrina ácida para amostras de leite adicionadas de 5, 10 e 20% de soro (Absorvância) ..... 91

Tabela 16. Teste de sensibilidade do método de ninidrina ácida para pequenas quantidades de soro adicionadas ao leite ..... 95

Tabela 17. Pesquisa de ácido siálico em amostras de leite coletadas na fazenda e na plataforma industrial ..... 97

Tabela 18. Pesquisa de ácido siálico comparando amostras de leite crú e pasteurizado ..... 99

Tabela 19. Comparação entre médias de absorvâncias para amostras de leite adicionadas de soro e submetidas à determinação de ácido siálico pelos métodos da ninidrina ácida e oficial ..... 103

Tabela 20. Absorvâncias de 56 amostras de soro de queijo submetidas à pesquisa para ácido siálico segundo método da ninidrina ácida ..... 117

Tabela 21. Interpretação Prática do método da ninidrina ácida para análise de leite em plataforma industrial (Proposição) ..... 123

Tabela 22. Qualificação do teste de ninidrina ácida para determinação de ácido siálico como " screening " de plataforma utilizando os resultados de fraude intencional de 5, 10 e 20% de soro de leite a leites autênticos ..... 124

# Índice de Figuras


Figura 1. Estrutura espacial da k-caseína ..... 10

Figura 2. Estrutura primária da k-caseína ..... 12

Figura 3. Estrutura química do ácido N-acetilneuramínico ..... 17

Figura 4. Estrutura química completa das 5 unidades de carboidratos isolados de k-caseínas ..... 19

Figura 5. Histograma da distribuição da frequência do teor de NANA da k-caseína bovina em 555 amostras de leite ..... 24

Figura 6. Efeito do tempo de aquecimento na produção de cor na reação da ninidrina ácida com o ácido N-acetilneuramínico ..... 54

Figura 7. Determinação de ácido siálico (NANA) em leite. Protocolo da Prova ..... 77

Figura 8. Curva Padrão de ácido siálico para o método de ninidrina ácida ..... 83

Figura 9. Corridas Espectrofotométricas para determinação do ácido siálico pelo método da ninidrina ácida ..... 85

Figura 10. Variação ponto a ponto na proximidade do comprimento de onda da leitura para determinação do ácido siálico pelo método da ninidrina ácida ..... 86

Figura 11. Efeito da adição de 5, 10 e 20% de soro em amostras de leite ..... 92

Figura 12. Comparação entre resultados esperados e obtidos para adição de soro às amostras de leite autênticos ..... 93

Figura 13. Teste de sensibilidade do método de ninidrina ácida frente à adição de pequenas quantidades de soro de queijo ao leite ..... 96

Figura 14. Comparação entre curvas padrão segundo metodologia oficial e da ninidrina ácida ..... 101

Figura 15. Comparação entre técnicas da ninidrina ácida e oficial. Resposta à adição de soro ..... 104

Figura 16. Comparação ponto a ponto entre as absorvâncias obtidas para a mesma amostra de leite pelos métodos da ninidrina ácida e oficial ..... 105

Figura 17. Histograma de frequência para resultados em absorvância de 114 amostras de leite autêntico ..... 111

Figura 18. Representação dos resultados de 114 amostras de leite crú autêntico ..... 112

Figura 19. Histograma de frequência para resultados em absorvância de 213 amostras de leite crú de plataforma ..... 114

Figura 20. Representação dos resultados de 213 amostras de leite crú de plataforma ..... 115

Figura 21. Histograma de frequência para resultados em absorvância de 327 amostras de leite crú ..... 118

Figura 22. Representação dos resultados de 327 amostras de leite crú ..... 120

# Resumo

A adulteração de leites, fluido e em pó, através da adição intencional de soro de queijo é um problema que vem preocupando as autoridades nacionais e internacionais. Isso ocorre em consequência do baixo valor comercial do soro e seu reduzido aproveitamento em derivados ou sub-produtos.

Desde 1959 há citações de métodos para a detecção dessa fraude, incluindo processos químicos, enzimáticos e outros mais complexos, como o CLAE. Muitos baseiam-se na pesquisa do ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico (NANA), um açúcar aminado ligado ao glicomacropeptídeo da k-caseína, liberado pela ação da quimosina (EC 3.4.23.4) durante a fabricação de queijos. Esses métodos detectam o ácido siálico livre e, portanto, as amostras de leite precisam ser submetidas à hidrólise ácida à quente.

No presente trabalho objetivou-se adaptar e padronizar o método da ninidrina ácida para a determinação quantitativa direta de ácido siálico em leite fluido e soro industrial.

Elaborou-se protocolo partindo de amostras de 10 ml de leite ou soro, cujos resultados, além de maior rapidez de obtenção, mostraram boa repetibilidade. O método mostrou-se sensível à adição de pequenas quantidades de soro, possibilitando sua aplicação prática.

O teor médio de NANA observado foi de 2,71 ± 0,83 μg/ml de leite certificadamente autêntico e de 42,35 ± 6,60 μg/ml de soro industrial.

A proposta de utilização do método como um teste de "screening" permite a classificação do leite em categorias como negativa, suspeita e positiva quanto à fraude por adição de soro, configurando variadas alternativas de interpretação na dependência do rigor a ser empregado.

# Summary

Adulteration of fluid and powder milk through intented addition of rennet whey is a problem which has been worrying national and international authorities. Such fact occurs due to the low commercial value of rennet whey and its reduced utilization in derivatives and byproducts.

Since 1959 there has been quotations of methods for detecting such fraud, including chemical, enzymatic and more complex processes, as HPLC. A number of them are based on researches regarding sialic acid or N-acetylneuraminic acid (NANA), an amino sugar linked to glycomacropeptide of k-casein and liberated by chymosin action (EC 3.4.23.4) during cheese production. Such methods detect free sialic acid, therefore, milk samples need to undergo heat acid hydrolysis.

The present study aimed at adapting and standardizing the acidic ninhydrin reaction for direct quantitative determination of sialic acid in fluid milk and rennet whey.

A protocol was elaborated from 10 ml samples, which results showed good repeatabality, as well as great rapidity in obtainment. This method presented itself sensitive to addition of small amounts of whey, making its pratical application possible.

The average content of NANA was 2.71 ± 0,83 μg/ml of certified authentic milk and 42.35 ± 6.60 μg/ml of rennet whey.

The proposal of utilization of such method as a screening test makes the classification of milk possible as negative, suspicious and positive regarding the fraud by whey addition, and it creates a range of interpretation alternatives depending on the rigor to be applied.

# I. Introdução

O baixo valor comercial do soro obtido durante o processo de fabricação de queijos, bem como o seu não aproveitamento pela grande maioria das empresas de laticínios estabelecidas no Brasil, torna-o um atrativo economicamente viável para a adulteração de leites fluido e em pó.

A detecção de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado é de grande importância para o país, pois sabe-se que esse tipo de fraude vem sendo praticado há anos (WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO, 1989).

Vários métodos para a determinação quantitativa da adição de soro de queijo ao leite de consumo tem sido estudados por inúmeros autores (WOLFSCHOON-POMBO,1984 ; LOKO, 1982; ORTIN & SANCHEZ, 1990a; FURTADO, 1989).

No Brasil, alguns métodos tem sido adotados pelos laboratórios oficiais e de referência. Atualmente estão implantadas (PORTARIA nº 124 de 23/09/91 do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária) as metodologias para a detecção de ácido siálico com o Reativo de Ehrlich e o de cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE). No entanto, a implantação dessas metodologias torna-se impraticável nos laboratórios de recepção de matéria-prima e controle de qualidade dos produtos, ao nível das indústrias de laticínios, pois o resultado do primeiro, além de demorado, sofre várias interferências e o segundo é limitante pelo alto custo da maioria dos equipamentos empregados e/ou a necessidade de mão-de-obra altamente qualificada (FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO, 1988).

Na literatura sobre o assunto, além dos métodos citados, dosagem de ácido siálico pelo reativo de Ehrlich e CLAE, há outras referências como os métodos de eletroforese, polarografia, determinação do teor de fosfatídeos e determinação do teor de aminoácidos sulfurados. Porém, nenhum desses métodos pode ser adequadamente utilizado como teste de rotina nas indústrias, isto é, nas plataformas de recepção onde o leite é selecionado.

A determinação do ácido siálico parece ser o método mais apropriado para a detecção da fraude em laboratórios industriais porque não requer mão-de-obra especializada nem equipamentos sofisticados.

O ácido siálico, cujo nome químico é ácido N-acetilneuramínico (NANA), é um açúcar aminado de baixo peso molecular (309,28 Daltons) e componente da principal glicoproteína do leite de vaca que é a *kappa*-caseína (MERCK INDEX, 1983).

A fração *kappa*-caseína é insensível aos sais de cálcio e por isso é a grande responsável pela estabilidade micelar da caseína. Ela é a fração protéica mais afetada quando em presença da enzima quimosina, que compõe os coalhos utilizados largamente na indústria de queijos (JOLLÈS & FIAT, 1979).

Na fabricação de queijos, quando o coalho é adicionado ao leite, ocorre uma hidrólise enzimática específica na ligação peptídica PHE (105) - MET (106) da *kappa*-caseína, por meio da qual o macropeptídeo hidrofílico, contendo moléculas de carboidrato (glicomacropeptídeo-GMP) é removido da fração *kappa*-caseína e passa para o soro (WOLFSCHOON-POMBO & PINTO, 1985).

As enzimas de microorganismos psicrotróficos, por sua atividade proteolítica, desenvolvem atividade semelhante ao coalho, levando a resultados falso-positivos na pesquisa do ácido siálico (WOLFSCHOON-POMBO & PINTO, 1985 ; FOX, 1989).

O leite apresenta um nível muito inferior de GMP em comparação com os soros de queijos (ORTIN & SANCHEZ, 1990a). Assim uma determinação seletiva de ácido siálico permite a detecção de soro eventualmente presente em leite crú ou pasteurizado (JOLLÈS & FIAT, 1979; WOLFSCHOON-POMBO & PINTO, 1985).

Um método novo para determinação de ácido siálico livre e ligado a sialoglicoproteínas, usando como reagente a

ninidrina ácida, foi descrito por YAO et alii (1989). O presente trabalho visa adaptá-lo à dosagem da glicoproteína do leite, obtendo uma economia de tempo na execução da pesquisa e favorecendo o estudo das interferências na prova, por ser um teste espectrofotométrico simples e rápido na faixa de radiação visível.

# II. Objetivos

Adaptar e padronizar método espectrofotométrico para a determinação quantitativa direta de ácido siálico em leites fluidos, com objetivo de implementá-lo como teste para a detecção de possíveis fraudes por adição de soro, tendo em vista sua utilização no contrôle de qualidade industrial e por órgãos governamentais de fiscalização.

# III. Revisão Bibliográfica

## 1. PROTEÍNAS DO LEITE

### 1.1. *COMPOSIÇÃO E NOMENCLATURA*

No leite normal, o conteúdo médio de proteínas é de 30-35 g por litro. Cerca de 80% dessas proteínas encontram-se sob a forma de complexos macromoleculares, contendo uma parte mineral (especialmente fosfato de cálcio), conhecidas sob o nome de micelas. As caseínas estão presentes, fundamentalmente nesta forma e contém ao redor de 8% de constituintes minerais (CHEFTEL et alii, 1989). Quase todas as caseínas são associadas com cálcio e fósforo em micelas de 20-300 um de diâmetro. As outras proteínas do leite, chamadas "proteínas do soro" ou "proteínas solúveis", são um grupo diverso incluindo a β-lactoglobulina, α-lactoalbumina, soroalbumina e as imunoglobulinas. (WONG et alii, 1988).

As substâncias nitrogenadas contidas em 1 litro de leite distribuem-se conforme Tabela 01.

Tabela 01. **Composição média das substâncias nitrogenadas do leite.**

<table>
<tr><td rowspan="8">PROTEÍNAS<br>33,5 g<br>aprox.</td><td rowspan="7">Protídeos</td><td colspan="2">Caseína Bruta</td><td>27,0 g</td></tr>
<tr><td rowspan="6">Proteínas<br>do<br>Lactosoro</td><td>B-lactoglobulina</td><td>3,0</td><td rowspan="6">6,2 g</td></tr>
<tr><td>A-lactoalbumina</td><td>1,2</td></tr>
<tr><td>Albumina sérica</td><td>0,4</td></tr>
<tr><td>Imunoglobulina</td><td>0,7</td></tr>
<tr><td>Proteoses-Peptonas</td><td>0,6</td></tr>
<tr><td>Proteínas menores</td><td>0,3</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">Aminoácidos<br>Oligopeptídeos</td><td colspan="2" rowspan="2">Nitrogênio Não Protéico</td><td rowspan="2">1,6 g</td></tr>
<tr><td colspan="3">Substâncias Nitrogenadas Não Protéicas<br>(uréia, ácido úrico, creatina, etc.)</td></tr>
</table>

Fonte: Veisseyre (1988)

Originalmente, o *Committee on the Nomenclature and Methodology of Milk Proteins* do *American Dairy Science Association (ADSA)* definiu as caseínas como as fosfoproteínas de leite crú desnatado que precipitam sob acidificação a pH 4.6 a 20$^{o}$C (JENNESS et alii, 1956) e as famílias identificadas, individualmente, por sua mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida contendo uréia (WHITNEY et alii, 1976). Com o conhecimento da homologia de suas estruturas primárias (sequência de aminoácidos), tornou-se possível classificá-las nas seguintes famílias: $\alpha$-$s_1$, $\alpha$-$s_2$, $\beta$ e k-caseínas (EIGEL et alii, 1984). Sua ocorrência é na proporção de 3/1/3/1 (GRAPPIN et alii, 1985). Sabe-se que nem todas as caseínas contém fósforo e que algumas são encontradas no soro ácido após a remoção do precipitado caséico (WONG et alii, 1988).

As cadeias peptídicas, cuja síntese ocorre na glândula mamária, estão programadas por um gen característico, pertencente a seis grupos principais: 4 para as caseínas ($\alpha_{s1}$, $\alpha_{s2}$, $\beta$ e k) e 2 para as proteínas solúveis ( $\beta$-lactoglobulina e $\alpha$-lactoalbumina). A síntese protéica nos ribossomos é seguida por modificações pós-translacionais, tais como fosforilação e glicosilação (CHEFTEL et alii, 1989).

As caseínas apresentam estrutura pouco ordenada porque são pobres em $\alpha$-hélices (CHEFTEL et alii, 1989).

A caseína $\alpha_{s1}$, com peso molecular de aproximadamente 23.600 Daltons (Da), é relativamente rica em fósforo (8-9 átomos por molécula), não contém glicídeos e é constituida por uma única cadeia polipeptídica com 199 resíduos de aminoácidos (EIGEL et alii, 1984; VEISSEYRE, 1988).

O grupo $\alpha_{s2}$, com 207 resíduos de aminoácidos, de peso molecular 25.230 Da, contém 10-13 átomos de fósforo por molécula, o que o torna o mais hidrófilo das caseínas. São componentes da família $\alpha_{s2}$-caseína: a $\alpha_{s5}$ que é um dímero composto da $\alpha_{s3}$ e $\alpha_{s4}$, atualmente denominadas $\alpha_{s2}$-CN A-12 P e $\alpha_{s2}$-CN A-11 P; $\alpha_{s6}$-CN, cuja nova nomenclatura é $\alpha_{s2}$-CN A-10 P e $\alpha_{s2}$-CN A-13 P (antiga $\alpha_{s2}$-CN A) (EIGEL et alii, 1984; GRAPPIN et alii, 1985).

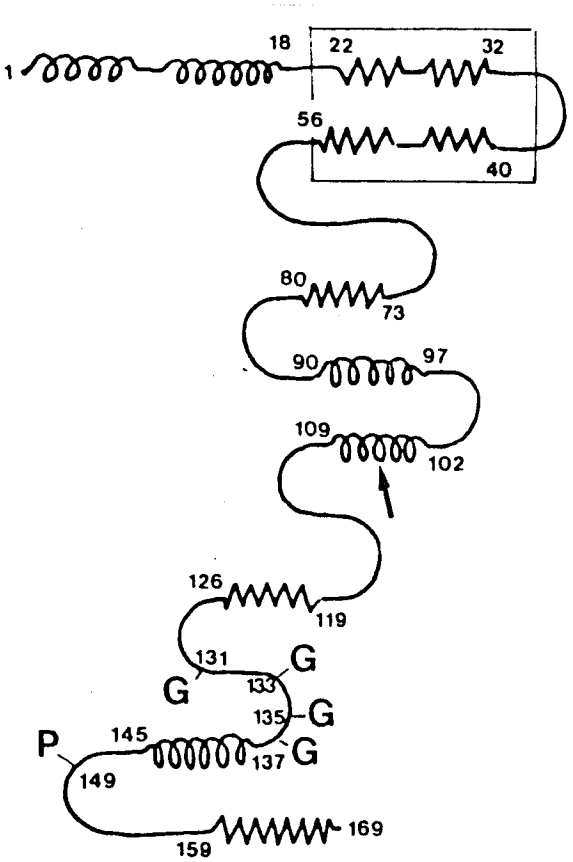
A $\beta$-caseína é solúvel em presença de cálcio.

Contém menos fósforo que a $\alpha_{s1}$ (4-5 átomos por molécula) e está constituida por uma só cadeia polipeptídica de 209 resíduos de aminoácidos, e peso molecular próximo a 24.000 Da (VEISSEYRE, 1988). É a mais hidrófoba das caseínas e, estruturalmente, apresenta cerca de 10% de $\alpha$-hélices, 13% de estruturas $\beta$ e 77% de estrutura não ordenada (EIGEL et alii, 1984; CHEFTEL et alii, 1989).

A família k-caseína (k-CN) encontra-se na forma de uma mistura de polímeros unidos por ligações dissulfídicas intermoleculares, de peso molecular 19.000 Da e 169 resíduos de aminoácidos. Sua estrutura secundária (Figura 01) apresenta 5 regiões ordenadas em $\alpha$-hélices, 7 regiões em estruturas $\beta$ (pregas) e 10 regiões $\beta$ em curvatura. É pobre em fósforo ( 1-2 átomos por molécula), fixa sómente alguns ions de cálcio e sua solubilidade não é afetada por essa presença. Possui um caráter anfipolar: sua parte N terminal é hidrófoba , enquanto que a C terminal contém uma ligação glicídica muito hidrófila (EIGEL et alii, 1984; CHEFTEL et alii, 1989).

A k-CN é a fração insensível ao cálcio e o principal componente afetado pela quimosina durante a primeira fase do processo de coagulação do leite. Em condições normais, desempenha um importante papel na estabilização da micela de caseína (JOLLÈS & FIAT, 1979), impedindo a precipitação da $\alpha_s$ e $\beta$-caseína , em presença de ions cálcio (SHAMMET et alii, 1992a). Variações na composição da k-CN modificam a estrutura e as propriedades da micela global da caseína. A k-CN está

diretamente implicada na estabilidade térmica do leite. Postula-se que a extensão da sua glicosilação pode afetar a qualidade industrial do leite (ROBITAILLE et alii, 1991a). Na k-CN, os pontos de ligação dos carboidratos são os resíduos de treonina, nas posições 131, 133 e 135 ou 136 (EIGEL et alii, 1984). SAITO & ITOH (1992) considera também, como resíduos de união a treonina-142 e a serina-141 sendo que a k-CN é glicosilada ao acaso. Segundo ROBITAILLE et alii (1991a), existem 5 possíveis sítios de ligação para oligossacarídeos, todos localizados na porção GMP.




↓: Sítio de ataque da quimosina
G: Parte glucídica

Fonte: Cheftel et alii (1989)

Figura 01. Estrutura espacial da k-caseína.

Trabalhando com leite concentrado livre de proteína de soro, aquecido à 135-140ºC/15 minutos e centrifugado à 100.000 g/1 hora, AOKI & KAKO (1985) separaram a caseína micelar da caseína solúvel. A k-CN representou 34% da fração CN-solúvel.

A k-CN constitui, aproximadamente, 8 à 12% da caseína integral (SAITO et alii, 1991) e como única fosfoglicoproteína do leite, contém acima de 15% (PM/PM) de carboidrato, sendo que uma significativa proporção (30-40%) consiste de um componente principal livre de açúcares e o restante, 6 componentes secundários glicosilados em diferentes graus (VREEMAN et alii, 1977). As estruturas dos componentes secundários da k-CN não estão bem estabelecidos. Acredita-se que são formas glicosiladas do componente principal (EIGEL et alii, 1984).

### *1.2. COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA - AÇÃO DA RENINA (QUIMOSINA - EC 3.4.23.4)*

A renina ou quimosina (EC 3.4.23.4), enzima predominante em coalho bovino, usada na fabricação de queijos, cliva especialmente a ligação peptídica PHE-MET da k-CN (SHAMMET et alii, 1992b).

A coagulação do leite começa quando essas enzimas coagulantes hidrolisam a k-CN. Essa proteólise limitada desestabiliza a micela e causa a sua agregação (SHAMMET et alii,

1992a), sendo considerada o primeiro passo seguido pela formação da estrutura de gel e a sinérese (LÉONIL & MOLLÉ, 1991).

Durante a primeira fase da ação da renina sobre a k-CN bovina, a união PHE (105)- MET (106) (Figura 02), é especificamente cindida: forma-se uma parte insolúvel, a para-k-CN (fração do substrato livre de açucar) que continua a compor a micela (resíduo 1 a 105 da k-CN) e uma parte solúvel é liberada, contendo o caseinoglicopeptídeo ou glicomacropeptídeo (CGP, GMP ou k-MP) (JOLLÈS & FIAT, 1979) onde todos os açúcares da molécula estão localizados (resíduo 106 à 109) (SAITO et alii, 1991). O GMP permanece solúvel no soro e é separado da coalhada durante a fabricação de queijos (SHAMMET et alii, 1992a,b).

1 10
PyroGlu - Glu - Gln - Asn - Gln - Glu - Gln - Pro - Ile - Arg - Cys - Glu - Lys - Asp - Glu - Arg - Phe - Phe - Ser-Asp

21 30
Lys -Ile - Ala - Lys - Pys - Ile - Pro - Ile - Gln - Tyr - Val - Leu - Ser - Arg - Tyr - Pro - Ser - Tyr - Gly - Leu

41 50
Asn - Tyr -Tyr - Gln - Gln - Lis - Pro - Val - Ala - Leu - Ile - Asn - Asn - Gln - Phe - Leu - Pro - Tyr - Pro - Tyr

61 70
Tyr - Ala - Lys - Pro - Ala - Ala - Val - Arg - Ser - Pro - Ala - Gln - Ile - Leu - Gln - Trp - Gln - Val - Leu - Ser

81 90
Asp - Thr - Val - Pro - Ala - Lys - Ser - Cys - Gln - Ala - Gln - Pro - Thr - Thr - Met - Ala - Arg - His - Pro - His

101 105↓ 106 110
Pro - His - Leu - Ser - Phe - Met - Ala - Ile - Pro - Pro - Lys - Lys - Asn - Gln - Asp - Lys - Thr - Glu - Ile - Pro

121 130 136
Thr - Ile - Asn - Thr - Ile - Ala - Ser - Gly - Glu - Pro - Thr - Ser - Thr - Pro - Thr - Thr - Glu - Ala - Val - Glu
*Variante B Ile*

141 148 150
Ser - Thr - Val - Ala - Thr - Leu - Glu - Asp - Ser - Pro - Glu - Val - Ile - Glu - Ser - Pro - Pro - Glu - Ile - Asn
*Variante B Ala*

161 169
Thr - Val - Gln - Val - Thr - Ser - Thr - Ala - Val.OH

Fonte: Eigel et alii (1984).

**Figura 02. Estrutura primária da k-caseína.**

O termo glicomacropeptídeo, historicamente, tem sido usado desde 1959, após caracterização de peptídeos isolados da fração nitrogênio não protéico (NNP). Em 1956, ALAIS encontrou 2 grupos de peptídeos, um deles, solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 2% e eletroforeticamente heterogêneo. NITSCHMAN et alii, em 1959, trabalhando com esse mesmo componente enquadrou-o entre 6.000 à 8.000 Da de peso molecular, constatando ligações com carboidratos, derivando daí sua nomenclatura (citados por BRUNNER &THOMPSON, 1959).

A sensibilidade única da ligacão PHE-MET, à hidrólise enzimática, tem despertado interesse. O dipeptídeo H-PHE-MET-OH não é sensível, mas, no pentapeptídeo H-SER-LEU-PHE-MET-ALA-OME a ligação é hidrolisada. Invertendo-se as posições dos resíduos serina e leucina nesse peptídeo para dar a correta sequência da k-caseína, aumenta-se a susceptibilidade da ligação PHE-MET à hidrólise pela quimosina. O comprimento do peptídeo e a sequência próxima ao sítio de clivagem são parâmetros importantes na interação enzima-substrato. Serina-104 parece ser particularmente importante e sua substituição por ALA no pentapetídeo torna a ligação PHE-MET muito resistente à hidrólise pela quimosina. De fato, o peptídeo representando a sequência HIS98-LYS111 (ou LYS112) inclue todos os determinantes necessários, demonstrando que a sequência ao redor da ligação PHE-MET, em vez da própria, compõem o sítio hidrolítico. A sequência LEU103 - ILE108, que provavelmente existe como uma estrutura estendida, encaixa o sítio ativo das proteínases

ácidas. Os resíduos hidrofóbicos PHE105 e MET106, tanto quanto a LEU103 e ILE108, são dirigidos às bolsas hidrofóbicas ao longo do sítio ativo, enquanto o grupo hidroxila da SER104 forma uma ponte de H com algum complemento da enzima. A sequência 98 para 102 e 109-111 formam a "β-turn" próxima à borda do sítio ativo no complexo enzima-substrato, sendo que essa conformação é estabilizada pelos resíduos de PRO nas posições 99, 101, 109 e 110. Os 3 resíduos de HIS (98, 100 e 102) e LYS111 estão, provavelmente, envolvidos em pontes eletrostáticas entre enzima e substrato (FOX, 1989).

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

### *1.3. HETEROGENEIDADE E GLICOSILAÇÃO DA k-CASEÍNA*

A k-CN bovina é heterogênea e esta característica pode ser atribuida tanto à variantes genéticas como também à composição do grupo carboidrato presente. Assim, por cromatografia em DEAE-celulose, mostrou-se que a k-CN pode ocorrer em frações livres ou ricas em açúcares, possuindo o mesmo esqueleto peptídico (JOLLÈS & FIAT, 1979).

Duas variantes genéticas, designadas por A e B, são conhecidas. A k-CN A-1P difere da variante B por substituição do resíduo de treonina por isoleucina na posição 136 e um resíduo de ácido aspártico por alanina na posição 148. A variante A tende a predominar. Em eletroforese alcalina em gel, na presença de mercapetanol e uréia, ambas as variantes mostram múltiplas bandas com a A possuindo maior mobilidade (EIGEL et alii, 1984).

O GMP da k-CN B é um peptídeo único, de peso molecular 6.755 Da. Contém 64 aminoácidos (4 Asp, 11 Thr, 6 Ser, 10 Glu, 8 Pro, 1 Gly, 6 Ala, 6 Val, 1 Met, 7 Ile, 1 Leu e 3 Lys), sendo pobre em aminoácidos sulfurados e destituido de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr e Trp), His e Arg (Tabela 02). A maioria

**Tabela 02. Composição de aminoácidos do glicomacropeptídeo (GMP) isolado do soro de queijo em pó e da k- caseína.**

| AMINOÁCIDOS | RESÍDUOS (mol de GMP) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | GMP Soro | GMP k-caseína | GMP k-caseína A-1P | GMP k-caseína B-1P |
| Ácido aspártico | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 4,0 |
| Treonina | 10,5 | 11,3 | 12,0 | 11,0 |
| Serina | 5,5 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| Acido glutâmico | 9,5 | 10,4 | 10,0 | 10,0 |
| Prolina | 7,5 | 8,1 | 8,0 | 8,0 |
| Glicina | 1,2 | 0,8 | 1,0 | 1,0 |
| Alanina | 5,2 | 4,5 | 5,0 | 6,0 |
| Valina | 5,3 | 5,3 | 6,0 | 6,0 |
| Metionina | 0,7 | 1,5 | 1,0 | 1,0 |
| Isoleucina | 5,5 | 5,8 | 6,0 | 7,0 |
| Leucina | 1,5 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Lisina | 2,7 | 3,1 | 3,0 | 3,0 |

Fonte: Saito et alii (1991)

das variações genéticas que causam a heterogeneidade da k-CN ocorre na região do GMP, que contém, também todas as ligações covalentes de carboidratos e os grupos fosfatos da k-CN (SHAMMET et alii, 1992b; KUMOSINSKI et alii, 1991).

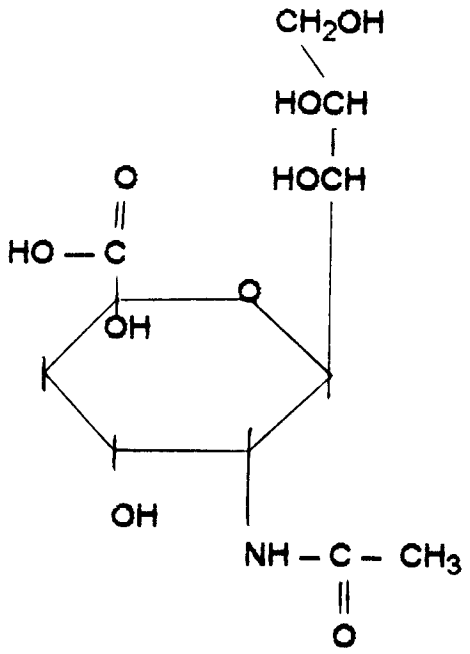
Na k-CN somente 3 açúcares diferentes foram identificados: galactose (GAL), N-acetilgalactosamina (GalNAc) e ácido N-acetilneuramínico (NeuNac ou NANA) (JOLLÈS & FIAT, 1979).

O ácido siálico ou ácido N-acetilneuramínico (NANA) pertence à família dos açúcares aminados, contendo 9 ou mais átomos de carbono ($C_{11}H_{19}NO_3$) (Figura 03), de peso molecular 309,28 Da, distribuindo-se amplamente no reino animal (MERCK INDEX, 1983).

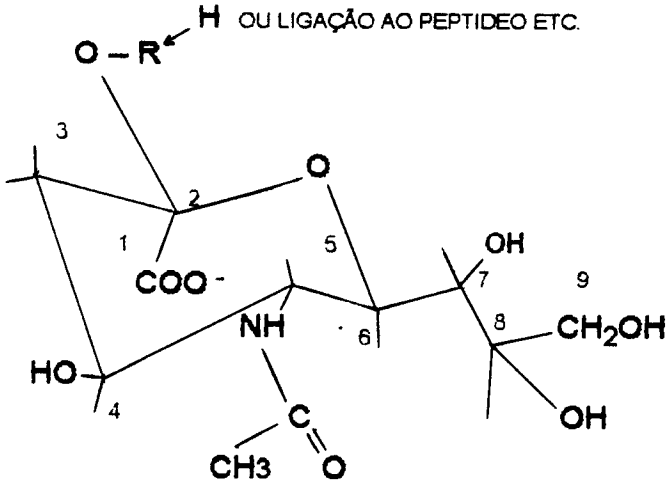
Membros da família do ácido siálico ocorrem numa variedade de tecidos, fluidos orgânicos, bactérias (principalmente E. coli) e incorporados à proteínas conjugadas (KABAT & MAYER, 1971). Os derivados do N-acetil, do ácido N-O-diacetilneuramínico e o N-glicolil, incluem-se entre os ácidos siálicos (WARREN, 1959).

Na k-CN, a estrutura secundária dos segmentos peptídicos próximo à ligação carboidrato-peptídeo é semelhante à outras glicoproteínas, sendo a ligação O-glicosídica Thr-GalNac situada na "β-turn". Essa observação sugere que os carboidratos da glicoproteína estão na sua parte externa ("β-turn"), isto é,

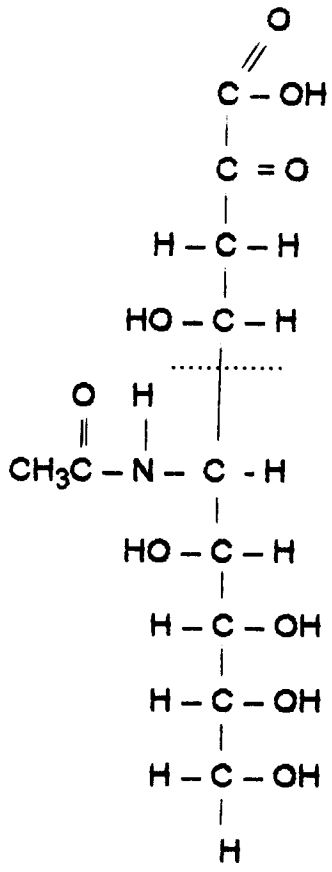
em espaço geometricamente bem definido e, consequentemente, permitindo uma aproximação fácil dos açúcares durante a biossíntese das cadeias glucanas (JOLLÈS & FIAT, 1979).




Fonte: Wolfschoon - Pombo (1984)




Fonte: Wolfschoon - Pombo (1984)




Fonte: Warren (1959).

Figura 03. Estrutura química do Ácido N-Acetilneuramínico (NANA).

A porção glicídica não é essencial à acão da quimosina nem às propriedades estabilizantes da k-CN. No entanto, os açúcares retardam a ação da enzima e a estabilidade das misturas de $\alpha_S$ e k-CN, em presença de cálcio, pode aumentar com o aumento do teor de carboidrato da k-CN (JOLLÈS & FIAT, 1979). Por seus estudos, OISHI & YOKOYAMA (1982) concluiram que a capacidade estabilizante da k-CN livre do ácido siálico não diminui quando comparada com a k-CN intacta. A remoção do NANA diminui a susceptibilidade da k-CN à hidrólise por quimosina. Em contraposição, KHALIFA et alii (1985a) afirmam que o ácido siálico contribui para a estabilidade do complexo caseína.

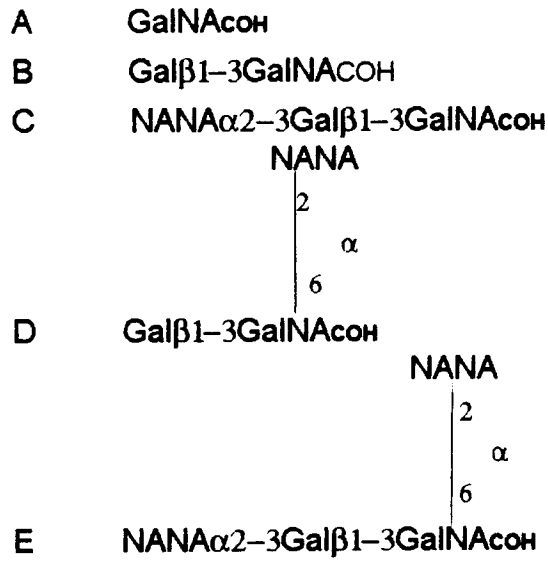
Para SAITO & ITOH (1992) o papel das cadeias de açúcar não está completamente elucidado. O nível de glicosilação da k-CN não parece influenciar a capacidade estabilizante da micela, mas a susceptibilidade à hidrólise com quimosina diminui quando o teor de carboidratos aumenta.

Em 1959, através de métodos clássicos, químicos e enzimáticos, e também por espectrometria de massa, estabeleceu-se a sequência detalhada de açúcares dos 2 principais carboidratos (JOLLÈS & FIAT, 1979):

Trissacarídeo NANA ---> Gal ---> GalNAc ---> Thr

Tetrassacarídeo NANA ---> Gal ---> GalNac ---> Thr
NANA

Atualmente, o conhecimento dessas sequências (Figura 04) ampliou-se, pois já se encontrou na k-CN quatro cadeias de açúcares O-glicosídicos : 1 dissacarídeo neutro, 2 isômeros de trissacarídeo ácido e 1 tetrassacarídeo ácido (SAITO & ITOH, 1992).




Fonte: Saito & Itoh (1992).

**Figura 04. Estrutura química completa das cinco unidades de carboidratos isoladas de k - caseínas.**

A composição de carboidratos de 5 frações isoladas por CLAE está resumida na Tabela 03. O GalNAc foi detectado em todas as frações. Isso sugere que todas as unidades de carboidratos são unidas O-glicosidicamente à k-CN através do

Tabela 03. **Composição de carboidratos de 5 oligossacarídeos A a E, isolados de k - caseína bovina.**

| Açúcares Identificados | Frações de Carboidratos Resíduos / mol | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | E |
| GalNACOH2 * | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Gal ** | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| NANA *** | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |

* - N-Acetilgalactosaminitol ** - Galactosil *** - N-Acetilneuraminil
Fonte: Saito & Itoh (1992)

GalNAc, em posição redutora-terminal com resíduos treonina ou serina. O NANA está contido nas frações C, D e E. Assim, confirmou-se que a fração A é monossacariditol (neutra), a fração B dissacariditol (neutra), as frações C e D trissacariditol (ácidas) e a fração E tetrassacariditol (ácidas) (SAITO & ITOH, 1992).

Na k-CN, a maioria dos carboidratos ocorrem como tri ou tetrassacarídeo contendo um açúcar ácido (NANA) como grupo terminal (ROBITAILLE et alii, 1991a).

A caracterização das 5 unidades de carboidratos, A a E, isoladas de k-CN e as porcentagens calculadas das molaridades estão resumidas na Tabela 04.

Tabela 04. **Distribuição de cada unidade de carboidrato ligada a k-caseína bovina determinada pelo Método CLAE.**

| | Unidades de Carboidratos mol/100 mol | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| k-Caseína | Monossacar. | Dissacar. | Trissacar. (reto) | Trissacar. (ramificado) | Tetrassacar. |
| a | 0,8 | 6,1 | 21,2 | 25,6 | 46,3 |
| b | 0,7 | 8,3 | 13,8 | 17,9 | 59,3 |
| c | 0,8 | 3,2 | 16,3 | 13,5 | 66,2 |
| d | 0,9 | 5,7 | 18,9 | 17,9 | 56,6 |
| e | 1,0 | 8,0 | 21,8 | 17,6 | 51,6 |
| Média± S | 0,8 ± 0,1 | 6,3± 1,8 | 18,4 ± 3,0 | 18,5 ± 3,9 | 56,0 ± 6,8 |

Fonte: Saito & Itoh (1992)

Para a k-CN, a média das 5 unidades de açúcar, A, B, C, D e E, foram 0,8 ; 6,3 ; 18,4 ; 18,5 e 56%, respectivamente. Assim, a cadeia tetrassacarídica predominou com 56% ± 6,8 ( $\bar{X}$ ± S ) do total de açúcares. Por outro lado, desse total, 7,1% corresponderam a açúcares neutros e, a quase totalidade, 92,9% , a açúcares ácidos ( SAITO & ITOH, 1992).

O teor de NANA da caseína bovina tem sido relatado por vários autores e tem sido usado como um índice do teor de k-CN em leite bovino desnatado. A liberação de peptídeos contendo NANA , solúveis em 12% TCA, tem sido usada para acompanhamento da cinética e extensão do primeiro estágio da ação da renina sobre a caseína bovina. MORRISSEY (1973), trabalhando com leite de várias espécies animais, cita como média para os bovinos, o teor de 17,7 mg/100 ml leite dos quais 14,2 mg foram encontrados na fração caseína. Acompanhando a lactação desse bovinos, encontrou para

amostras coletadas 3 dias após o parto, a média de 33,9 mg NANA/100 ml. Esse resultado foi 2 vezes maior que o obtido para amostras de leite em meio de lactação (14,3 mg/100 ml). O teor de 21,8 mg/100 ml foi a média para leite de final de lactação.

Inicialmente elevado, o teor de NANA apresenta uma pequena diminuição, nos primeiros 2-3 meses para em seguida aumentar gradualmente até o final da lactação (GUÉRIN et alii, 1974; ROBITAILLE et alii, 1991a).

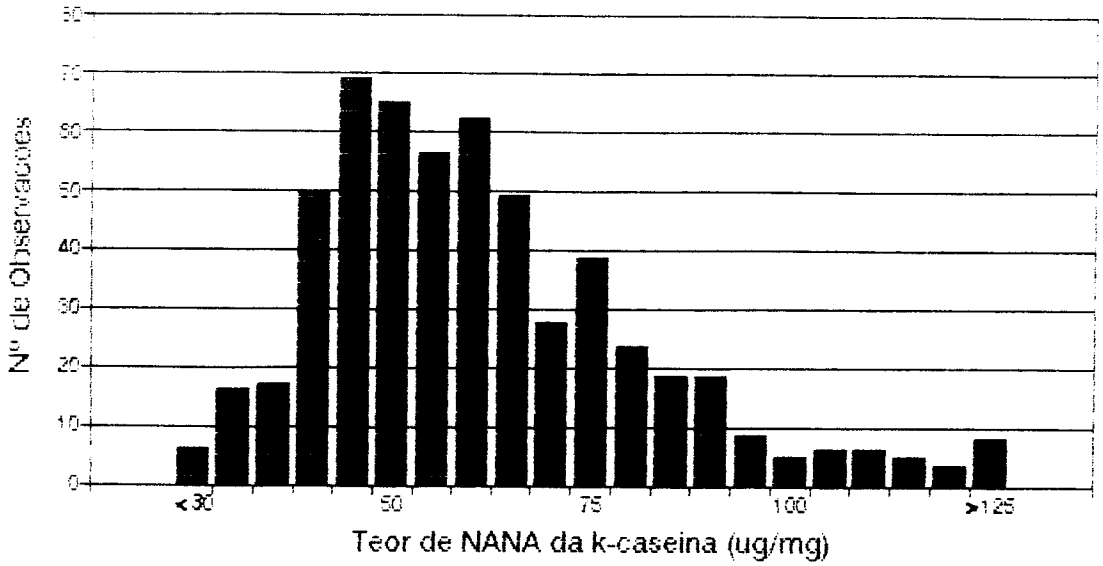
HOFI et alii (1982) também analisando leite de várias espécies, encontraram que, para bovinos, o teor de NANA na proteína total era de 16,90 mg/100 ml dos quais 74% estavam na fração caseína mas que somente 50-55% do NANA da caseína foi liberado como GMP pela ação da quimosina.

Submetendo a fração k-CN, com diferentes teores de ácido siálico, às temperaturas de 70, 85, 100, 120 ou 140$^{o}$C por 5 minutos, KHALIFA et alii (1985b) observaram que a liberação do NANA da k-CN aumentava proporcionalmente com a severidade do aquecimento mas era menor nas frações ricas em NANA; à 120 e 140$^{o}$C, respectivamente, cerca de 30 e 50% do ácido siálico solúvel em pH 4,6 era liberado.

Um do métodos utilizados para monitorar a ação coagulante baseia-se na determinação do ácido N-acetil-neuramínico, um indicador específico da liberação do GMP. O principal problema com a determinação do NANA é que ele não

apresenta-se, igualmente, em todas as moléculas, podendo até mesmo estar ausente em alguns macropeptídeos liberados pela quimosina (LÉONIL & MOLLÉ, 1991). Uma faixa de valores de 1,81-2,5% foi relatado por MACKINLAY & WAKE para o teor de NANA da k-CN (citados por MORRISSEY, 1973) enquanto que para AOKI & KAKO (1985) a k-CN solúvel contém 2,31 % e a k-CN micelar 2,1% de NANA.

ROBITAILLE et alii (1991a) estudaram pelo período de um ano, 555 amostras de leite de 53 fêmeas bovinas da raça Holstein, analisando-as quanto ao teor de NANA, k-CN e células somáticas (SCC). Os autores utilizaram o método colorimétrico do ácido periódico-tiobarbital para quantificar o teor de NANA na k-CN integral do leite. A aplicação de um teste comparativo usando NANA comercial demonstrou que no mínimo 90% do NANA foi efetivamente recuperado após a hidrólise ácida . Quando as micelas de caseína foram coaguladas enzimaticamente pela quimosina, antes da hidrólise ácida, menos de 15% do NANA original foi detectado no pellet da caseína, comprovando sua associação à fração GMP. A média do teor de NANA da caseína dessas 555 amostras foi de 5.64 µg/mg caseína, com uma faixa variando de 2,1 à 11,2 µg/mg. Quando expressa em termos de k-CN, o valor médio para o teor de NANA foi 63 ± 21 µg/mg k-CN com variação de 23 à 166 µg/mg. A distribuição da frequência do teor de NANA na k-CN é apresentado na Figura 05.




**Fonte: Robitaille et alii (1991a)**

Figura 05. **Histograma da distribuição da frequência do teor de ácido N-acetilneuramínico (NANA) da k-caseína bovina em 555 amostras de leite.**

O teor médio de NANA na caseína obtido por ROBITAILLE et alii (1991a),apresenta-se muito próximo ao relatado por MORRISSEY (1973), de 6,0 µg/mg para leite de tanque de armazenamento e levemente superior ao relatados por MARIER et alii (1963), de 0,26 à 0,59 % do teor de caseína e 2,14% na fração k-CN.

Em relação à fração k-CN, ROBITAILLE et alii (1991a), obtiveram uma média de 63 ± 21 µg/mg k-CN. Desses valores deduziu-se a taxa de 4 mol NANA/mol k-CN (massas moleculares: k-CN = 19 KDa; NANA = 309 Da), com um mínimo de 1.4 mol/mol k-CN. A variação do teor de NANA na k-CN, observada entre as amostras de leite, não é somente devida ao teor de k-CN mas também à eficiência da glicosilação dessa, durante o processo de

secreção. A extensão da glicosilação da k-CN é muito variável criando glicosilações diferentes em número e ordem. Além disso, amostras de leite podem ter diferentes teores de NANA na caseína. MARIER et alii (1963) e MORRISSEY (1973), relataram variações no teor de NANA na caseína integral devido a diferentes estágios de lactação e entre fêmeas. Entretanto, estes resultados devem ser interpretados com cautela, pois é sabido que flutuam com fatores genéticos e ambientais, não considerados, além do número limitado de amostras analisadas (ROBITAILLE et alii, 1991a).

Os multipicos do GMP (1 a 5), observados em CLAE, são, presumivelmente, provenientes da microheterogeneidade das cadeias de açúcar, especialmente o número de resíduos de NANA (ROBITAILLE et alii, 1991a).

Por eletroforese e cromatografia de troca iônica, técnicas baseadas na diferença de carga elétrica, a variabilidade da glicosilação da k-CN pode ser presumida. Assim, concluiu-se que o teor de NANA da k-CN pode refletir a porcentagem total da glicosilação da k-CN em leite (ROBITAILLE et alii, 1991a).

Os resultados obtidos por ROBITAILLE et alii (1991a) mostraram que todos os fatores estudados (parição, dia do teste, estágio de lactação, fenótipo da k-CN, número de células somáticas e variação individual das fêmeas) afetavam significativamente ($P < 0,01$) o teor de NANA na k-CN. Observaram ainda, uma diminuição dos valores de NANA com o aumento do número de partos e uma elevação significativa do teor de NANA para

contagens celular somática superior à 200.000 células/ml.

Esta última conclusão coincide com a observação de SINGH & GANGULI (1975), mostrando que o NANA tende a aumentar somente durante a mastite clínica.

Quanto ao aspecto fenotípico, a separação dos animais produtores em 2 grupos diferentes (AA e AB) para a k-CN evidenciou teores de NANA mais elevados no grupo AB, sugerindo que a variante B sofreria uma glicosilação mais eficiente.

Ao comparar vacas genotipadas AA x BB e AA x AB, MARIANI et alii (1984) observaram que o tipo AA possui teor menor de NANA na caseína total (0,37%) que o tipo BB (0,52%). NA segunda relação encontrou 0,29% para AA contra 0,38% para AB.

Os resultados obtidos nesses estudos, levaram ROBITAILLE et alii (1991a) a concluir que a variação da glicosilação da k-CN foi refletida pelo teor de NANA da k-CN, e significativamente afetada por fatores genéticos e ambientais.

ROBITAILLE et alii (1991b) encontraram, para leite da ordenha da manhã, a concentração de 63,6 ± 20.4 µg NANA/mg k-CN. Grandes variações foram observadas nos parâmetros estudados (produção, proteína, gordura, caseína, número de caseína, SCC, NANA/k-CN). Os efeitos dos fatores ambientais (parição, estágio e lactação, SCC e estação da parição) no rendimento e composição do leite estiveram de acordo com os resultados prévios obtidos para

produção e composição diária de leite. Neste estudo, o fenótipo k-CN afetou significativamente ($P < 0.05$) o teor de proteína e caseína. Demonstraram, ainda, que o grau de glicosilação da k-CN estava associado ao rendimento da ordenha da manhã e, provavelmente com a produção diária. Um aumento da glicosilação da k-CN no leite de vacas Holstein foi seguido de um aumento da produção de leite, sem nenhum efeito adverso nos teores de proteína, gordura e caseína. Entretanto, a relação NANA/k-CN é um parâmetro quantitativo, amplamente variável sob condições genéticas e ambientais dificultando sua definição para um animal, impedindo sua utilização como uma marca bioquímica com o intuito de predizer um desenvolvimento futuro de fêmeas (ROBITAILLE et alii, 1991b).

## 2. SORO

### *2.1. OBTENÇÃO, PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO*

O soro é a porção aquosa do leite , separada do coágulo durante a fabricação de queijos ou caseína. Há dois tipos de soro, doce e ácido (SAITO et alii, 1991).

O soro ácido provém de queijos obtidos por coagulação ácida, como o requeijão e o "*cottage-cheese*". A coagulação ácida (abaixamento do pH ao ponto isoelétrico da caseína, ao redor de 4,6) processa-se através da acidificação

microbiológica por culturas láticas selecionadas, acidificação artificial (por ácidos comestíveis) ou contaminantes naturais (OLIVEIRA, 1986).

O soro doce resulta da ação da quimosina sobre o leite, na produção de queijos curados como o Prato, Minas, Chedar, Suiço, Gouda, etc.. A coagulação enzimática ocorre no pH natural do leite, em torno de 6,6. É no soro doce que se inclue o GMP (OLIVEIRA, 1986).

O soro é constituído, em média, de 6,5% de sólidos totais, sendo 5% de lactose, 0,8% de proteína, 0,6% de cinzas, 0,2% de NNP e 0,5% de gordura (HARPER & SEIBERLING, 1976). A fração protéica, de alto valor biológico, é composta por $\alpha$-lactoalbumina e a $\beta$-lactoglubulina que compreendem cerca de 90% das proteínas do soro, imunoglobulinas, proteose-peptona e em particular, o glicomacropeptídeo (SAITO & ITOH, 1992) .

Por ser rico em lactose, proteína, vitaminas e minerais, o soro pode ser usado numa larga variedade de produtos, tais como: ração animal, fórmulas infantis, bebidas e confeitos (SAITO & ITOH, 1992).

Apesar da carência protéica mundial, somente pequena parcela da produção total de soro é utilizada. No entanto, o desenvolvimento de novos produtos e a preocupação com a poluição ambiental deverá provocar, futuramente, um aumento substancial de seu aproveitamento (WEBB et alii, 1978).

A produção de queijos de 1985 e 1986, segundo estatística da Secretaria de Inspecão de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura (ANUÁRIOS ESTATÍSTICOS, 1985 e 1986), girou em torno, de 153 e 173 mil toneladas, respectivamente, originando, em média, cerca de 1,4 bilhões de litros de soro por ano.

## *2.2. DETECÇÃO DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE SORO*

As autoridades sanitárias brasileiras e internacionais preocupam-se com o adequado destino do soro proveniente da fabricação de queijos. O soro por apresentar alto valor nutritivo, representado por teores consideráveis de albumina e sais minerais, em vez de ser descartado como ocorre em larga escala, deveria ser industrializado. A maior preocupação das autoridades recai sobre a possibilidade, sempre presente, da utilização do soro para aumentar, fraudulentamente, o volume do leite "in-natura", causando profundas alterações nas características originais do produto oferecido ao consumo (PANETTA et alii, 1987). Na Europa e América do Norte, o principal problema é a adulteração de leite em pó desnatado, contrastando com a América Latina, onde o problema crescente é a adição ilegal do soro ao leite pasteurizado (WOLFSCHOON-POMBO & FURTADO, 1989).

Pela legislação brasileira, o artigo 543 do

Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - R.I.I.S.P.O.A.(1952) considera como fraude a adição de qualquer substância ao leite.

A adição de soro ao leite, apesar de não acarretar problemas diretos ou imediatos à Saúde Pública, contraria a Lei nº 8078 de 11/09/90 (Código de Defesa do Consumidor), por ser enganosa, uma vez que não é declarada em rotulagem. Essa mistura leite e soro traz vantagens econômicas, apenas para o fraudador, nada beneficiando o consumidor.

As autoridades da Comunidade Econômica Européia preocuparam-se em detectar essa possível fraude de adição de soro, procedente da fabricação de queijos, em leite em pó desnatado (*JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENES, L.213/3-6) E REV. DA CEE 2188/1985*). Para garantir a pureza do leite desnatado em pó destinado à estocagem pública, a CEE, através do Regulamento nº 625/78 de 30/03/78 decidiu que este tipo de leite não deve conter produtos estranhos, notadamente leitelho e soro de leite (LOKO, 1982).

SADINI (1984), integrante da *Commission Working Group da CEE* ,acrescenta que pela R625/78 toda partida de leite em pó desnatado deve ser de primeira qualidade e ser submetida ao controle governamental dentro de um mês após a fabricação. Atividades prévias desta comissão, envolvendo 12 laboratórios, no trabalho de exame de amostras de leite em pó desnatado com um grupo básico de análises (umidade, gordura, proteína total e

cinzas) resultaram na introdução de um método oficial para detectar soro no leite destinado à estocagem pública, prescrito na Regulamentacão da CEE nº 2188/81 para implantação em janeiro de 1982.

SADINI & RAMPILLI (1985) salientaram a urgência da questão referente ao leite em pó desnatado liberado para estocagem pública e ao leitelho em pó liberado para ração animal com pagamentos de subsídios. Diferentes aspectos foram levantados quanto ao mercado desses produtos, nos países europeus, como a venda de leite em pó por intermédio de agências, a adoção de subvenções, comércio intracomunidades e o comércio com terceiros países.

Com este problema ocuparam-se também LECHNER & KLOSTERMEYER (1981) na República Federal Alemã, RAMPILLI & SADINI (1984/85) na Itália, LOKO (1982) na França, KONING & ROOIJEN (1971) e OLIEMAN et alii (1983) na Holanda (citados por WOLFSCHOON-POMBO, 1984).

### *2.2.2. EVOLUÇÃO DOS MÉTODOS*

Desde 1959, tem-se citações de metodologias para a detecção de soro adicionado ao leite utilizando o orcinol, resorcinol, difenilalanina, Ehrlich, ácido perclórico-triptofano, ácido hidroclorídrico, ácido acetil sulfúrico e periodato-tiobarbitúrico (WARREN, 1959; KABAT & MAYER, 1971;

JOURDIAN et alii, 1971). Esses métodos tem baixa especificidade e não podem ser aplicados em determinações diretas de ácido siálico em tecidos e outros materiais biológicos. WARREN (1959), adaptando o teste do ácido tiobarbitúrico, conseguiu aumentar a formação de cor para ácido siálico, após oxidação do periodato com solução ácida forte e extração da solução colorida final com ciclohexanona. A absortividade molar obtida foi 12 vezes maior que o método do resorcinol. O teste do ácido tiobarbitúrico foi suficientemente sensível para permitir a determinação direta e precisa do ácido siálico contido nos tecidos.

Para a determinação de NANA livre, AMINOFF (1961) trabalhou com o método do ácido tiobarbitúrico modificado por WARREN e com o método alcalino de EHRLICH. Para o método do ácido tiobarbitúrico encontrou, à 549 nm, a absortividade molar de 70,7 x $10^3$ e para o método de Ehrlich, à 558 nm, 7,7 x $10^3$. Para ambos os métodos a absortividade molar foi diretamente proporcional à concentração de ácido siálico.

De KONING et alii, em 1966 (citado por POTGIETER, 1985) descreveram um método para a detecção de soro em pó em leite em pó, baseado na presença de ácido neuramínico contido no GMP. Segundo esses autores, a adição de 2% ou mais de soro em pó (obtido por secagem pelo sistema de atomização) pode ser detectado. Esse método torna-se limitado pelo fato de altas temperaturas associadas a outros processos de secagem (tambor ou rolo) liberarem parte do GMP. O método foi adaptado pela C.E.E. para a detecção de soro em leite em pó desnatado destinado ao uso

público.

A Tabela 05 mostra o impacto do aquecimento sobre o nível de ácido siálico:

**Tabela 05. Efeito do tratamento térmico na concentração de ácido siálico em leite.**

| | mg NANA / g CN integral $\bar{X} \pm s$ |
|---|---|
| Controle (leite crú) ..... | 3,66 ± 0,16 |
| Pasteurização (71°C/15') ..... | 3,59 ± 0,12 |
| Superaquecimento (85°C/10')..... | 3,24 ± 0,12 |
| Fervido (ponto de fervura) ..... | 3,23 ± 0,10 |
| Esterilização (10 lb/15') ..... | 2,96 ± 0,11 |

Fonte: Arumughan et alii (1979)

A pasteurização parece não alterar a integridade da caseína, mas o teor de NANA diminui com o aumento da temperatura. Esta diminuição pode ser devido à liberação do GMP, pois, como foi mais tarde demonstrado, este GMP liberado por aquecimento é similar em composição ao liberado pela ação da renina e esta liberação ocorre em temperatura abaixo de 50°C (ARUMUGHAN et alii, 1979).

KOONING & ROOIJEN (1971) desenvolveram um método colorimétrico baseado na correlação entre o teor de aminoácidos sulfurados (cisteína e cistina) da caseína e da soroproteína do leite. Essa relação altera-se em casos de adição de soro de queijo ao leite. Observaram que, independentemente do estado de

agregação da proteína, o método determinava a presença de soro em caseína co-precipitada e em misturas artificiais de leite em pó e proteínas do soro. Isso porque pode-se considerar que o conteúdo de cisteína+cistina da caseína e das proteínas do soro, em valores médios de 0,26 e 3,06 respectivamente, perfazem uma relação que resulta num fator praticamente constante. Na prática, promove-se a completa hidrólise da proteína seguida da redução da cistina à cisteína por reação com dithiothreitol, e determinação colorimétrica dessa com o reagente de GAITONDE (ninidrina ácida). A fórmula utilizada para a determinação das proteínas do soro foi:

$$\% \text{ Proteína Soro} = \frac{X - 0{,}26}{3{,}06 - 0{,}26} \times 100$$

onde: X = % de cisteína+cistina na CN co-precipitada

0.26 = valor médio do teor de cisteína-cistina da CN integral

3.06 = valor médio do teor de cisteína-cistina da proteína do soro.

A % de proteína do soro adicionada era calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de Adição de Proteína de Soro} = \frac{X - 0{,}70}{3{,}06 - 0{,}70} \times 100$$

para: X = teor de cisteína+cistina da mistura

0,70 = média do teor de cisteína+cistina em 100% de proteína.

Usando a mesma relação (KONING & ROOIJEN, 1971),

isto é, a diferença entre os valores de cisteína-cistina na caseína e fração protéica do soro, MROWETZ & KLOSTERMEYER (citado por POTGIETER, 1985 e por FURTADO, 1989) descreveram em 1976, um método polarográfico para determinação de 5% ou mais de soro em pó em leite em pó.

Um progresso nessa técnica polarográfica foi enunciado, em 1981, por LECHNER & KLOSTERMEYER (1981). O teor de cisteína-cistina da proteína foi estimada como a diferença entre os picos do polarograma. A precisão do método foi de 1,6% para leite autêntico, com um coeficiente de variação de 3,66% para soro em pó (com alto teor de aminoácidos sulfurados). Estimativas do teor de proteína do soro em misturas conhecidas de soro e leite desnatado, em pós, mantiveram-se abaixo de 3% em relação ao valor real.

A regulamentação 625/78 da CEE propõe os métodos de análise polarográfica do complexo cisteína-cistina, dosagem de GMP e observação microscópica em luz polarizada. Para estudar certas influências nas metodologias citadas, principalmente quanto ao envelhecimento do leite, LOKO (1982) classificou os leites de mistura em 2 categorias: uma que chamou de "A" (de qualidade superior, recepcionado na indústria de transformação imediatamente após a coleta, com uma população microbiana $\leq 2 \times 10^5$) e outra de "B" (leite recepcionado nas centrais de secagem,geralmente após trânsito dentro de pelo menos uma unidade de transformação, com uma população $\leq 10^6$). Amostras desses leites foram cuidadosamente desnatadas à 37°C e depois mantidos

em tanques de refrigeração à 7º C, durante o período do teste (6 dias). Alíquotas destes leites foram desidratadas diariamente e analisadas logo após o processamento. As análises usadas foram: a dosagem de NANA livre, de acordo com o *Journal Officiel de Communauté Europeéne de 01/08/1981 (nº L 213/3-6)* e a investigação microscópica segundo o método de J. MOL (citado por LOKO, 1982).

Para leites de 48 h pós-ordenha, a dosagem de NANA foi sempre inferior à 50 µg/g leite em pó. Para leites de 72 h de estocagem refrigerada, observou-se após processamento um acréscimo de 20% no teor de NANA livre, verificando-se, em seguida uma diminuição, tornando a elevar-se à partir de 120 h , chegando a 58% do teor inicial ao fim do experimento (144 h) (LOKO, 1982).

Quanto à flutuação do teor de NANA, os leites "A" e "B", apresentaram, praticamente a mesma progressão logarítmica, levando LOKO a concluir como variação média, para um leite ordenhado há 96 h, um acréscimo de 50% em relação ao teor inicial.

A observação microscópica à luz polarizada baseia-se na visualização de estruturas cristalizadas de leite em pó desnatado em solventes. O processo de concentração do soro para secagem provoca cristalização dos sais de cálcio e fósforo, existentes no soro sob a forma coloidal. Isso ocorre dentro das mesmas condições de supersaturação e temperatura exigidos para a

cristalização da lactose, também presente no soro. Esses cristais, em configurações diversas (aculeiformes, rosetas e fragmentos refringentes), são evidenciados em preparações com óleo de parafina (lactose) e com lugol ou dimetilsulfóxido (cálcio e fósforo).

No leite normal, não ocorre a presença desses cristais. Quando encontrados, provém de possível adição de soro, devendo-se, porém, considerar a obtenção de estruturas não idênticas para processos de secagem diferentes.

A avaliação microscópica é rápida e confiável apesar das dificuldades citadas. Por outro lado trata-se de um bom método para a detecção da adição de produtos estranhos aos pós, principalmente se realizada como prévia seleção a fim de evitar eventuais investigações mais complexas e onerosas (LOKO, 1982).

SERRINI et alii (1981) compararam 2 métodos citados pela CEE. O método 1 envolve a precipitação, à pH 4,6, da caseína de leite em pó desnatado reconstituído mais a precipitação de outras proteínas com ácido tricloroacético (TCA) 12%, seguido de precipitação do GMP com ácido fosfotúngstico (PTA) e liberação do NANA do GMP por hidrólise. A estimação do complexo colorido NANA-ácido tiobarbitúrico é feita à 550 nm em etanol. O método 2 omite a precipitação da caseína e estima o NANA no complexo com resorcinol que é extraído com álcool isoamílico, à 580 nm. O método 2, além de ser mais simples,

forneceu um coeficiente de variação de ± 2,02% quando comparado com 2,96% do método 1. Os autores citam, também que, amostras de leite em pó desnatado, normalmente, contém 35-70 µg de NANA/g na forma de GMP. A adição de 1% de soro em pó aumentaria esse valor cerca de 10 µg/g.

Foram publicados, na área da CEE, dois métodos oficiais baseados, o primeiro na determinação do ácido siálico livre e o segundo , na determinação dos glicomacropeptídeos (GMP) por CLAE (ORTIN-RODRIGUES & SANCHEZ-ALGABA, 1990a).

O método analítico preconizado pelo Regulamento da CEE (1981) baseia-se na determinação do ácido siálico liberado pela ação do coalho. O GMP livre é separado da maior parte dos componentes do leite, por precipitação com TCA e, após filtração é precipitado com ácido fosfotúngstico (PTA). O ácido siálico é liberado do precipitado por hidrólise, à quente, com ácido sulfúrico diluido. Com resorcinol forma-se um composto colorido que se mede à 580 nm por espectrofotometria (ORTIN-RODRIGUES & SANCHEZ-ALGABA, 1990a).

Um protótipo de aparelho para automatização da detecção de soro em leite em pó, pelo método GMP foi descrito por LORENZ et alii (1982). O método baseava-se na precipitação da proteína e do GMP e consequente medição por turbidimetria. O autor sugeriu sua utilização como "screening" em leite em pó.

Na Holanda, HOOYDONK & OLIEMAN (1982) relataram o

uso de CLAE para determinar a quantidade de GMP liberado pela ação da quimosina no leite, como método sensível e facilmente automatizado. A repetibilidade do método foi muito boa, considerando a necessidade de pequenas quantidades de amostras pré-tratadas. O TCA 12% foi utilizado para inativar a enzima e precipitar seletivamente a caseína e as proteínas do soro. A concentração final de TCA 8% foi considerado ideal pois não provoca a precipitação das proteínas do soro. Concentrações menores resultam numa remoção insuficiente dessas proteínas e concentrações maiores precipitam inclusive o GMP.

OLIEMAN et alii (1983) citam como limite de detecção por CLAE, valores de 0,5% em amostras de leite alemão e 0,8% para leite de outros países do CEE. Afirmam também que os resultados não foram influenciados pelo processo de secagem do leite desnatado mas que resultados falso-positivos devem-se à ação das proteinases bacterianas no leite, antes da secagem.

MEHRENS & REIMERDES (1986) estimando, por CLAE, a adição de soro ao leite em pó desnatado apresentaram como limite de detecção um mínimo de 0,7%. Os autores consideraram a CLAE mais específico que a detecção do ácido siálico no filtrado de TCA.

Para SADINI (1984), apesar do método descrito na R.CEE nº 2188/81 ser satisfatório para análises de leites em pó desnatado fresco destinado à estocagem pública, a fórmula, baseada no teor de ácido siálico livre (ppm) e porcentagem de

proteína, não é suficientemente eficaz para a detecção de soro em leite em pó desnatado utilizado para ração animal. O procedimento pode ser aperfeiçoado pela introdução de um terceiro parâmetro, chamado de teor de proteína do precipitado fosfotúngstico. Esse N-fosfotúngstico é obtido submetendo-se, ao processo Kjeldahl, o resíduo das precipitações das frações protéicas com o TCA 12% e PTA 20%. Em paralelo à esse procedimento, determina-se quantitativamente o teor de proteína total. A relação R entre o ácido siálico livre e o teor de proteína do leite no sedimento fosfotúngstico pode ser assim calculado:

$$R = 100 \times \frac{\text{Ácido Siálico livre (ppm)}}{\text{Teor de N fosf. x 6,38 (ppm)}}$$

Para leite desnatado em pó, o valor de R varia entre 5 à 7, enquanto que para soro é sempre superior a 10 ( em média 12).

POTGIETER (1985), na África do Sul, estudou o método do ácido N-acetil-neuramínico implantado pela CEE em 1981, onde o teor de ácido siálico de uma amostra suspeita é determinado de duas maneiras, isto é, uma colorimétrica (valor Z), usando uma curva de calibração e outra determinando sua relação com o teor de proteína da amostra (valor Y).

A relação do NANA com o teor de proteína da amostra (Y) é determinada pela fórmula:

$$Y = 40 + 3 \ ( X - 34)^2$$

sendo: X = % de proteína total determinada pelo método Kjeldahl.

A CEE sugere, como média, o valor de 40 ug NANA/g de leite em pó para uma amostra contendo no mínimo 34% de proteína. No entanto, POTGIER (1985) encontrou para amostras de leite contendo de 31 à 36 % de proteína, a variação de 50 à 90 µg NANA/g pó.

Esses valores Z e Y compõem a seguinte fórmula para a determinar a porcentagem de soro em pó presente em leite em pó:

$$\% \text{ de Soro em pó} = \frac{Z - Y}{1000} \times 100$$

onde: Z = teor de ácido siálico da amostra determinado colorimetricamente (µg NANA/g leite em pó)

Y = teor médio de ácido siálico livre na amostra calculado em relação ao teor de proteína da amostra ( µg NANA/g leite).

1000 = teor representativo de ácido siálico no soro em pó. (RAMPILLI et alii, 1985).

O problema decorrente desse método é a indicação de resultados falso-positivos. Isso talvez ocorra pelo fato de que os valores de ácido siálico testados por grama de leite em pó exceda o valor da CEE de 40 µg/g para um mínimo de 34% de proteína que é aplicado na conversão da fórmula ( POTGIETER 1985).

A relação entre o teor de ácido siálico e a porcentagem de soro adicionado foi excelente (coeficiente de correlação = 0,996) mas a fórmula da CEE para determinação desse soro em pó é precisa para a adição de até 20 % ( POTGIETER, 1985).

Embora esse método apresentasse excelente repetibilidade (para amostras em quadruplicatas o coeficiente de variação foi menor que 5%) , a reprodutibilidade foi muito pobre quando foi aplicado nas mesmas séries de amostras em diferentes dias. Isto pode ser explicado pela presença de pequenas quantidades de lactose residual nas amostras, que reagiriam com resorcinol usado na determinação do ácido siálico (POTGIETER, 1985).

WOLFSCHOON-POMBO (1984) discute várias técnicas de detecção de soro adicionado ao leite em pó. O primeiro método discutido é baseado na determinacão do ácido siálico (metodologia da CEE), preconizando a fórmula para calcular a quantidade de soro adicionada ao leite:

$$\text{\% de Soro em pó} = \frac{Z - Y}{W} \times 100$$

onde: Z = valor de NANA determinado na amostra.

Y = valor médio de NANA no leite em pó.

W = valor médio de NANA no soro em pó.

Para a implantação dessa metodologia no Brasil, o autor adverte sobre a necessidade de se conhecer profundamente o teor de ácido siálico no leite, soro, leite e soro em pó. Cita como valor médio, para leite desnatado em pó, a faixa de 40-50 mg/g e que o soro em pó contém aproximadamente 10-20 vezes mais ácido siálico.

WOLFSCHOON-POMBO (1984) discute 3 outras metodologias: a de CLAE utilizando o método dos holandeses van HOOYDONK e OLIEMAN (1982); a da observação microscópica de uma suspensão de produto, pelo método de MOL e LOKO (1982); a determinação do teor característico e diferente dos aminoácidos sulfurados cisteína e cistina. Essa metodologias já foram discutidas aqui. WOLFSCHOON-POMBO cita ainda a determinação do teor de fosfatídeos e do teor de lactato para soros ácidos.

WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (1985) adaptaram o método espectrofotométrico para detecção e quantificação de soro em leite em pó, substituindo o reagente cromogênico original (resorcinol) pelo reativo de Ehrlich (paradimetilbenzaldeído com HCl fumegante). Com isso várias etapas, como o uso de solução tampão para extração do ácido siálico liberado por hidrólise e/ou a extração do cromóforo formado com resorcinol, foram simplificadas, tornando o método qualitativo para leite fluido. Mesmo na adaptação, a pesquisa é sobre o ácido siálico livre, liberado da fração protéica, através de hidrólise ácida (80$^{o}$C/40 minutos). Esse binômio tempo/temperatura deve ser mantido para

evitar-se uma significativa destruição do açúcar liberado. Este método permite detectar a adição de 2% ou mais de soro em leite fresco pasteurizado e em amostras de leite armazenadas, como filtrados de TCA, por 3 semanas. Resultados falso-positivos foram obtidos em amostras de leite pasteurizado refrigeradas por 3 dias à 6°C (não filtradas em TCA), porém isso não ocorreu em leite pasteurizado com 2 dias de estocagem a frio.

WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (1985) consideraram também, a possível presença de enzimas proteolíticas bacterianas devido ao crescimentos de microorganismos psicrotróficos, do tipo da Pseudomonas fluorescens, em leite crú resfriado e que teriam ação similar ao coalho. Proteases psicrotróficas por serem termoresistentes não seriam inativadas durante o processo de pasteurização (72-75°C/15-20 segundos). Tem-se como necessário, para uma atividade proteolítica significante, populações > $10^6$ ufc/ml. Proteinases de leucócitos possuem ação semelhante mas são menos ativas que as proteínases bacterianas (FOX, 1989).

ATROSHI et alii (1986), ao estudarem rebanhos sadios e mastíticos encontraram a média de concentração de NANA para vacas saudáveis de 51,43 ± 4.8 µg/ml enquanto que para animais mastíticos este valor correspondeu a 107.86 ± 12.2 ($p < 0,01$). Em casos severos de mastites (todos os 4 quartos positivos para bactéria e SCC > 3 x $10^6$ células /ml leite) a concentração de ácido siálico foi 4 vezes maior que a das amostras de leite não mastíticos. Patologicamente é muito interessante a participação do ácido siálico em sítios de ligação

de bactérias, vírus e outros agentes infecciosos, apesar que o seu papel fisio-patológico não está bem definido.

Ao acompanhar a lactação de vacas sadias e mastíticas, GAJDUSEK (1987) observou que a concentração de NANA total foi mínima no meio da lactação, aumentando no final, sendo que os teores máximos foram encontrados em vacas mastíticas. Quanto aos teores de NANA ligado, foi mínimo no meio da lactação, enquanto que ao final, alcançou níveis mais elevados.

Em 1987, PANETTA et alii, avaliaram o método proposto por WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (1985). Setenta e cinco amostras de leite de mistura foram submetidas à prova de soro, contagem de bactérias psicrotróficas, prova de cloreto e Whiteside. Concluiram que a sensibilidade da prova é de 100% para a adição experimental de soro de queijo obtido por coalho, mas possui baixa especificidade (75%) para ser adotada como método fiscal para análise de leite. Esta especificidade é alterada em amostras suspeitas para cloreto e/ou Whiteside, bem como pelo número de psicrotróficos. Como a qualidade do leite pasteurizado não reflete as condições bacteriológicas do produto crú, a presença de proteínases termoresistentes, podem interferir no produto empacotado, levando a resultados falso-positivos.

FURTADO & WOLFSCHOON-POMBO (1988) apresentaram um novo método para a quantificação de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado através da determinação do número de caseína. As amostras de leite e soro sofrem um pré-tratamento (desnate em

centrífuga refrigerada), para depois serem analisadas quanto ao seu teor de fósforo total ($P_T$), fósforo caseínico ($P_{CAS}$), fósforo solúvel em ácido tricloroacético ($P_{TCA}$), nitrogênio total ($N_T$), nitrogênio não protéico (NNP) e nitrogênio protéico ($N_P$).

De posse desses valores, o número de caseína, que nada mais é que a porcentagem do nitrogênio caseínico no nitrogênio protéico, pode ser calculado através da fórmula:

$$\text{Nº de Caseína} = \frac{N_{caséico}}{N_{protéico}} \times 100$$

sendo: $N_t - NNP = N_p$ (g% na amostra)

$P_t - P_{tca} = P_{cas}$ (g% na amostra)

$(P_{cas} : 0,85 : 6,34) \times 100 = N_{cas}$

onde: $0,85 = P_{cas}/100g$ de caseína

6,34 = fator Kjehdahl de conversão de N para proteína

Em casos de leite adulterado altera-se a relação $N_{soroproteínico}/N_{cas}$ pela diminuição do teor relativo das caseínas. Essa relação no leite autêntico é de 20/80. A adição de soro de queijo diminui o número de caseína do leite, como se observa na Tabela 06.

DIRKS & REIMERDES (1988), da *Commission Working Group da CEE*, conduzindo estudos paralelos na Alemanha, Inglaterra e Itália, opinaram que métodos para detecção de soro adicionado ao leite, baseados na determinação de ácido siálico

ligado a gangliosídeos, parecem não ser inteiramente satisfatórios devido a enorme variação do seu conteúdo.

**Tabela 06. Interferência da adição de soro no número de caseína.**

| % de Soro Mistura | Nº de Caseína | % de Soro Mistura | Nº de Caseína |
|---|---|---|---|
| 0 | 80,9 | 60 | 64,2 |
| 10 | 79,3 | 70 | 58,0 |
| 20 | 77,4 | 80 | 49,4 |
| 30 | 75,2 | 90 | 37,4 |
| 40 | 72,3 | 100 | 14,6 |
| 50 | 68,8 | | |

Fonte: Furtado (1989)

ORTIN-RODRIGUES & SANCHEZ-ALGABA (1990a), na Espanha, também estudando o método da CEE, aplicaram a seguinte fórmula tanto para leite líquido como para leite em pó desnatado:

$$\text{ug de Ácido Siálico livre / g amostra} = \frac{C \times 8}{M \times (ESD + 0,2)} \times 100$$

onde: C = leitura da amostra na curva padrão em µg/g de ácido siálico.

M = massa em g dos 50 ml de leite líquido.

ESD = % extrato seco desengordurado do leite líquido.

0,2 = teor convencional, em % de matéria gorda, correspondente ao leite líquido desnatado.

Aplicando a fórmula anterior às misturas de leite crú e soro submetidas ao método analítico recomendado pela CEE (1981) obtiveram os resultados apresentados na Tabela 07.

**Tabela 07. Valores de ácido siálico (µg/g) estimados pelo método da CEE.**

| Amostra Utilizada | Ácido Siálico µg / g |
|---|---|
| Leite crú | 65,0 |
| Leite em po reconstituido | 68,1 |
| Leite com 20% de soro | 228,9 |
| Leite com 40% de soro | 410,0 |
| Leite com 60% de soro | 404,9 |
| Leite com 80% de soro | 506,8 |
| Soro liquido | 699,1 |

Fonte: Ortin-Rodriguez & Sanchez-Algaba (1990a)

O soro líquido e misturado ao leite foi aquecido à 70°C por 10 minutos, para inibir uma possível ação hidrolítica do coalho residual do soro sobre o leite.

Trabalhando , também com amostras de leite UHT de um mesmo lote, ORTIN-RODRIGUEZ & SANCHEZ-ALGABA (1990b) submeteram-nas à determinação de ácido siálico (método da CEE). As alíquotas foram tomadas considerando o tempo de fabricação. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 08. Ao estudarem o fenômeno de precipitação de leite UHT que apresentava baixa

acidez total, encontraram uma relação entre o conteúdo de NANA livre e a tendência para gelificação.

**Tabela 08. Determinação de ácido siálico em leite UHT de acordo com tempo de fabricação (Método CEE).**

| Tempo de Fabricação (dias) | Ácido Sialico µg / g |
|---|---|
| 1 | 30,60 |
| 18 | 61,70 |
| 28 | 121,30 |
| 47 | 151,55 |
| 157 | 387,50 * |

* Leite UHT gelificado
Fonte: Ortin-Rodrigues & Sanchez-Algaba (1990a)

ORTIN-RODRIGUEZ & SANCHEZ-ALGABA (1990b) prosseguindo em seus estudos, procuraram correlacionar os níveis de amoníaco e ácido siálico em leites UHT, verificando que esses dois parâmetros estão intimamente relacionados com o tempo que transcorre entre a fabricação e o armazenamento, em temperatura ambiente, desse tipo de leite.

MOTTAR et alii (1991) encontrou, para 41 amostras de leite, através ensaio colorimétrico em determinação enzimática, a média de 9,0 ± 4,0 mg/l para NANA livre.

### *2.2.2. METODOLOGIA ANALÍTICA OFICIAL*

Preocupado com o problema de fraude de soro de queijo em leite de consumo, o MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA

AGRÁRIA, através da Portaria nº 124 de 23/09/91, aprovou e oficializou os métodos analíticos, qualitativo e quantitativo, de detecção de soro em leite, determinando o seu emprego em todas as atividades desenvolvidas pela rede oficial do sistema coordenado pela Divisão de Laboratório Animal do Departamento Nacional de Defesa Animal. As metodologias implantadas foram, respectivamente o método adaptado por WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (1985) e a CLAE.

O Método Qualitativo de Detecção de Soro ao Leite tem como princípio a precipitação do ácido siálico contido no GMP resultante da ação da renina sobre o leite. Para tanto, parte-se da precipitação protéica das amostras de leite com ácido tricloroacético (TCA) 24% (tem-se na mistura 12%). Após filtração qualitativa convencional, procura-se isolar o GMP da fração solúvel em TCA (filtrado TCA), utilizando-se o ácido fosfotúngstico (PTA) 20% como método seletivo. A mistura do filtrado TCA e PTA é submetida à centrifugação e o sobrenadante obtido é desprezado. Para evitar-se a interferência da lactose presente no filtrado TCA é necessário que ela seja removida pela eliminação do sobrenadante após a precipitacão com PTA e lavagem com etanol; de outra forma, poderia mascarar os açúcares glicopeptídeos e levar a um falso resultado (WOLFSCHOON-POMBO & PINTO, 1985). O ácido siálico ligado ao GMP, então, é liberado através hidrólise ácida à quente e detectado como cromóforo púrpura após reação com o p-dimetilaminobenzaldeído. O leite pasteurizado por não conter GMP livre não desenvolve a cor púrpura (PORTARIA nº 124/ M.A.).

O método da pesquisa do ácido siálico, conforme recomendações do Ministério da Agricultura, sempre deve ser feito em paralelo com um leite sabidamente genuíno. Essa técnica não é válida para soro obtido por precipitação ácida e os resultados negativos para ácido siálico nem sempre significam ausência de soro.

A Detecção de Soro de Leite por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - Método da Filtração em Gel também determina a quantidade de GMP em leite filtrado após tratamento com TCA. Seguindo metodologia de CLAE convencional, calcula-se o fator de resposta R do pico do GMP. O pico do GMP é:

$$\text{Pico do GMP} = P / A$$

onde: P = quantidade de soro de um ponto da curva padrão

A = área ou altura do pico do GMP obtida no mesmo ponto da curva padrão.

O cálculo da quantidade de soro na amostra é:

$$\% S = R \times Aa$$

onde: S = porcentagem de soro (P/$\rho$) na amostra

R = fator de resposta do pico do GMP

Aa = área ou altura do pico do GMP da amostra

O Ministério da Agricultura recomenda que de 0 à 16% o coeficiente de correlação da curva padrão tem que ser superior a 0,9900. Se ocorrer a presença do equivalente a mais de 1% de soro, determinado a partir da curva padrão nos picos com o

mesmo tempo de retenção do GMP, a prova será considerada positiva.

## 3. PESQUISA DIRETA DE NANA EM MATERIAIS BIOLÓGICOS ( METODOLOGIA DA NINIDRINA ÁCIDA )

YAO & UBUKA (1987) desenvolveram uma nova técnica, para determinar a concentração de ácido siálico em sialoglicoproteínas contidas no líquido ascítico formado pela introdução de células tumorais na região peritoneal de ratos.

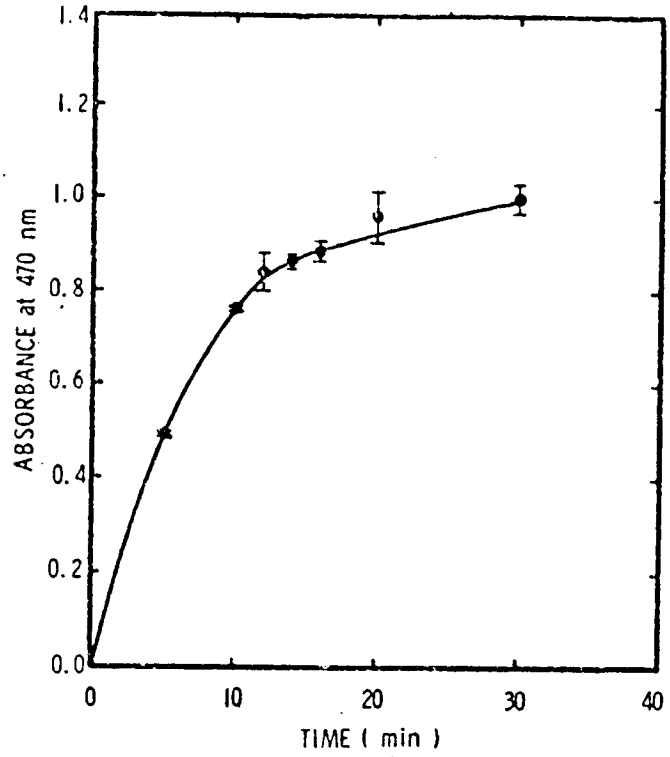
O método baseia-se na reação do ácido siálico com o reagente 2 de GAITONDE, isto é , a ninidrina ácida, que produz uma cor estável com uma absorção máxima à 470 nm. A curva padrão é linear na faixa de 5-500 nmol de NANA por 0.9 ml de reação de mistura. Esta reação mostrou-se específica somente para ácido siálico entre vários açúcares e derivados de açúcares testados. Alguma interferência foi notada nesse método, pela cisteína, cistina e triptofano, embora as suas absorções máximas difiram da do ácido siálico (560, 489 e 385nm respectivamente). Em seus experimentos, YAO & UBUKA (1987) eliminaram essas interferências com o uso de pequena coluna de resina de troca iônica. Como teste comparativo utilizaram o método do periodato-resorcinol e o ácido siálico foi isolado de fluido peritoneal ascítico de ratos.

A determinação dos ácidos siálicos livres foi desenvolvida de acordo com o método de GAITONDE (1967), para

pesquisa de cisteína, com as seguintes modificações : à 0.3 ml da solução da amostra (contendo 5-500 nmol de NANA) acrescentou-se 0.3 ml de ácido acético glacial e 0.3 ml de ninidrina ácida (reagente 2). A mistura de reação é aquecida em banho-maria fervente por exatamente 10 minutos e após resfriada em banho de gelo, mede-se a absorvância à 470 nm. O tempo de de aquecimento é importante já que a absorção à 470nm aumenta proporcionalmente com o tempo de incubação acima de 10 minutos e vai aumentando gradualmente, até alcançar o máximo ao redor dos 30 minutos. O desenvolvimento da cor aos 10 minutos corresponde, aproximadamente, a 75% da dos 30 minutos. Acima de 10 minutos, a absorvância, para um tempo de incubação definida, foi constante entre determinações desenvolvidas ao mesmo tempo. No entanto, o rendimento de cor, em reações com tempo mais prolongado tendem a variar como mostra a Figura 06.

Com o tempo de aquecimento de 10 minutos, adotado como procedimento padrão, o desenvolvimento da cor foi bastante estável (YAO & UBUKA, 1987) . A diminuição na absorvância foi menor que 4% após 3 horas à $0^{\underline{o}}$, $16^{\underline{o}}$ ou $37^{\underline{o}}$C. A absortividade molar do ácido N-acetilneuramínico, nas condições dos testes, foi de $6.64 \times 10^3$ .

A sensibilidade da reação foi bastante alta e comparável ao da reação do periodato-resorcinol, largamente usada. Os valores obtidos por este último método foram levemente inferiores àqueles obtidos pelo metodo desenvolvido por YAO & UBUKA (1987), além do que, este é muito mais simples e o tempo




Fonte: Yao & Ubuka (1987)

Figura 06. **Efeito do tempo de aquecimento na produção de cor na reação da ninidrina ácida com o ácido N-acetilneuramínico.**

requerido, em todo o processo, é menor que a metade do utilizado pelo do periodato-resorcinol.

YAO et alii (1989) descreveram o mesmo método da ninidrina ácida modificado para a determinação direta de ácidos siálicos ligados à glicoproteínas. A reação de mistura foi alterada para 3.0 ml (1.0 ml da solução da amostra, 1.0 ml de ácido acético glacial e 1.0 ml de ninidrina ácida). Novamente esta técnica foi comparada com a do periodato-resorcinol e também outras proteínas foram a ela submetidas. Os resultados encontrados (absorvância de 0,122 para uma concentração de 50

nmol), indicaram que a reação da ninidrina ácida é específica não somente para ácidos siálicos livres como também para ligados. A única proteína que reagiu com a ninidrina ácida foi a fetuína que numa concentração de 500 μg acusou uma absorvância, à 470 nm, de 0,292.

A curva padrão da fetuína pela reação da ninidrina ácida e pelo método do periodato-resorcinol foi praticamente a mesma. A sensibilidade de ambos os métodos foi igual. A estabilidade da cor produzida pela reação de ninidrina ácida manteve-se estável, no mínimo por 3 horas, à temperatura ambiente.

Este método foi aplicado para a determinação de ácido siálico em liquido peritoneal de ratos da mesma maneira que foi aplicado para fetuína.

## 4. FRACIONAMENTO DE PROTEÍNAS

Segundo CHRISTENSEN et alii (IDF nº 261/1991) há diferentes técnicas de fracionamento químico dos compostos nitrogenados do leite, cuja escolha depende da finalidade requerida.

O fracionamento das substâncias nitrogenadas totais do leite, conforme ASCHAFFENBURG & DREWRY (citados por

VEISSEYRE, 1988), pode ocorrer pela acidificação à pH 4.6 ou pela adição de soluções como o sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$ ) e ácido tricloroacético (TCA) 12%.

Ao acidificar-se o leite com ácido acético 10%, até o seu ponto isoelétrico (pH 4,6) obtém-se um precipitado formado por caseínas e peptídeos de alto peso molecular. A fração solúvel a pH 4,6, muito heterogênea, é composta por 10-23% do teor de N solúvel. Quando essa fração é submetida à $Na_2SO_4$ 12% precipita as proteoses-peptonas, restando solúveis as proteínas lactoalbumina e imunoglobulina e o NNP.

Quando se acrescenta ao leite uma solução de $Na_2SO_4$, ocorre a precipitação das caseínas, imunoglobulinas e proteoses-peptonas. A albumina e o NNP continuam solúveis no filtrado. Esse mesmo filtrado quando acidificado a pH 2 separa a α-lactoalbumina e soroalbumina da parte solúvel que contém a β-lactoglobulina e o NNP.

Para se precipitar as proteínas totais , separando-as do NNP e oligopeptídeos, o fracionamento clássico é com TCA. Diferentes concentrações de TCA tem sido estudadas: 2%, 2,5% e 12% - esses valores referem-se à % de TCA na solução final. Estudos com concentrações mais baixas demonstraram que 25% do N total é solúvel em TCA 2% sendo que aproximadamente 10% da fração N-solúvel precipita. Com TCA 2,5% conseguiu-se 29% do N total. O uso de SDS-PAGE demonstrou que o TCA 2.0% precipita grandes peptídeos. A fração solúvel contém pequenos e médios

peptídeos e aminoácidos. Num estudo de solubilidade de peptídeos em várias concentrações de TCA, YVON et alii (citado por CHRISTENSEN et alii, 1991) encontraram que somente 6 dos 75 peptídeos identificados derivando da $\alpha_{s1}$, $\beta$ e k-caseína eram insolúveis em alguma das concentrações de TCA (2 à 12 %) enquanto 39 eram completamente solúveis em todas as concentrações de TCA usadas. A solubilidade de 30 peptídeos diminuiu com o aumento da concentração de TCA. A cadeia dos peptídeos variou de 2 a 63 resíduos de aminoácidos. Experimentos mostraram que 44 - 64% do N solúvel à pH 4.6 o era também em TCA 12%. A fração solúvel em 12% TCA contém pequenos peptídeos (2-20 resíduos de aminoácidos) enquanto que médios e grandes peptídeos são encontrados no precipitado. YVON et alii (citado por CHRISTENSEN et alii, 1991) observaram que, independentemente de outros parâmetros, a hidrofobicidade dos peptídeos influenciou na solubilidade em TCA.

O percentual encontrado de precipitação proteína/peptídeo com etanol 70% é o mesmo que com TCA 12% enquanto que o fracionamento dos componentes nitrogenados com ácido sulfosalicílico não é frequentemente usado (CHRISTENSEN et alii, 1991).

O fracionamento com água tem sido largamente usado para queijos e como parâmetros operacionais utiliza-se a quantidade da amostra, temperatura e a duração de homogeneização, para se obter um porcentual maior dos compostos nitrogenados na fração solúvel em água. Estudos eletroforéticos em gel mostraram que a fração solúvel contém proteínas do soro, peptídeos de baixo

peso molecular provenientes da hidrólise da caseína e aminoácidos livres. A fração não solúvel em água contém caseínas e produtos de alto peso molecular da hidrólise da caseína (CHRISTENSEN et alii, 1991).

Fracionando-se com $CaCl_2$ em solução a 0.037 M pode-se solubilizar 35% do N total. Os componentes obtidos nas frações não solúveis são,aparentemente, idênticos com as proteínas e peptídeos das frações não solúveis em água e a pH 4.6 (CHRISTENSEN et alii, 1991).

Há outros tipos de fracionamento, por exemplo, com NaCl 5% (solubiliza caseína e produtos hidrolíticos da caseína) ou com cloroformio-metanol, usado para isolar peptídeos hidrofóbicos correspondentes aos peptídeos amargos em queijos (CHRISTENSEN et alii, 1991).

O fracionamento com ácido fosfotúngstico é um método muito seletivo em relação a pesos moleculares e útil para subfracionamento da fração solúvel em água. Somente peptídeos de baixos pesos moleculares (< 600 Da) e aminoácidos são extraídos. A fração solúvel em PTA 5% contém proteínas e peptídeos com PM > 600 Da (RANK, 1985).

# IV. Material e Métodos

## 1. MATERIAIS

### 1.1. *Vidrarias, Utensílios e Outros*

- Frascos plásticos de boca larga para coleta de amostras de leite e soro;
- Pipetas graduadas de 5 e 10 ml;
- Pipetas automáticas para 0.1, 0.5 e 1.0 ml;
- Beckers de 50 e 100 ml;
- Tubos de ensaio e de centrífuga;
- Cubetas para espectrofotometria;
- Bastão de vidro e funil;
- Papel de filtro qualitativo;
- Bico de Bunsen e tela de amianto;

**Observação:** Toda a vidraria utilizada, bem como frascos de coletas encontravam-se quimicamente higienizados quando do seu uso.

## 1.2. *EQUIPAMENTOS*

- Banho-Maria - Fanem
- Centrifugador Excelsa-2 - Fanem - mod 205-N
- Centrífuga Refrigerada - IEC- B-20A
- Centrífuga Refrigerada Spin VI - Incibrás
- Balança Semi-Analítica - OWA - Labor
- Balança Micronal - B-6000
- Espectrofotômetro - Spectronic 70 (Bausch & Lomb)
- Espectrofotômetro - Micronal - B-380
- Estufa de Secagem e Esterilização com circulação ativa Fanem - mod 320-SE
- Agitador Magnético com aquecimento - Corning
- Freezer e Geladeira comerciais
- Destilador - Fanem - mod 724/2-1
- Deionizador - Permution

## 1.3. *REAGENTES*

- Ácido Siálico (N-acetylneuraminic Acid) Type IV, 95%, Sinthetic, LOT 98 FO 652 / A-2751 - Sigma Chemical CO.
- Ninidrina (Merck,Riedel)
- Ácido Clorídrico P.A. (Ecibra, Nuclear, Merck,Reagen)
- Ácido Acético Glacial ( Merck)
- Ácido Tricloroacético 24% (Merck, Vetec)
- Ácido Sulfúrico 0.1 N (Reagen)
- Ácido Fosfotúngstico 20% (Sinth)

Observação: A solução de ácido fosfotúngstico foi armazenada em

frascos de cor âmbar e sempre tomou-se a precaução de trabalhar com preparações recentes a fim de evitar alterações que podem ocorrer, com o passar do tempo, como o escurecimento da solução e formação de depósitos. Quando isto ocorre o PTA deve ser descartado e nova preparação efetuada.

- Etanol 95% (Ecibra, Merck)
- Solução de p-dimetilaminobenzaldeido a 5% (p/v) (Reagen)
- Acetona (Merck)

**NINIDRINA ÁCIDA: Reagente 2 de GAITONDE**

1,0 g de ninidrina, 16 ml de ácido clorídrico P.A., 24 ml de ácido acético glacial.

**REAGENTE de EHRLICH:**

solução de p-dimetilaminobenzaldeido a 5% (p/v) em partes iguais de ácido clorídrico fumegante e água destilada.

## 2. AMOSTRAS

### 2.1. *ACONDICIONAMENTO*

As amostras foram coletadas em frascos plásticos ou de vidro, de boca larga, com tampas, bem higienizados e transportadas até o laboratório, devidamente identificadas e acondicionadas em caixa isotérmica com gêlo.

Os latões de onde coletou-se as amostras, quando o teste a ser realizado assim o exigisse, foram identificados para coleta posterior, na plataforma do laticínio.

As amostras eram submetidas, pelo menos, à primeira fase do teste (precipitação protéica com TCA 24% e filtração), imediatamente após a coleta.

## 2.2. *COLETA*

- *LEITE CRÚ AUTÊNTICO:* As amostras foram coletadas nas próprias fazendas produtoras de leite , durante a ordenha matutina. Dependendo da produção e/ou da etapa do trabalho, a amostra representou um "pool" do leite produzido por vários animais, isto é, uma amostra por latão, ou do total dos latões da propriedade.

- *LEITE CRÚ DE PLATAFORMA:* As amostras foram coletadas durante a recepção dos latões nas plataformas de 3 laticínios da região de Barretos/SP. As amostras foram tomadas ao acaso, representando um "pool" por produtor ou tomadas dos latões identificados nas fazendas.

O horário de coleta variou das 10 às 12 horas e o leite foi deixado em temperatura ambiente até a coleta do último produtor (no dia), simulando o mesmo tempo de transporte para todas as amostras. Da coleta até o início do teste, as amostras

foram guardadas sob refrigeração.

- *SORO INDUSTRIAL:* Das queijarias da região de Barretos/SP, coletou-se quantidades variadas de soro, sempre da produção de queijos do dia.

Os soros foram obtidos da produção de queijos de coagulação enzimática, e que não sofreram adição de sal e/ou corante à massa durante seus processamentos. A maioria dos soros foi proveniente de queijos tipo mussarela e minas.

As amostras de soro industrial foram submetidas à temperatura de 80ºC por 15 minutos em banho-maria, para inativação da enzima do coalho. As amostras assim processadas foram analisadas no mesmo dia ou foram subdivididas, identificadas e congeladas para uso posterior.

- *LEITE ADICIONADO DE SORO:* Para várias etapas do experimento, fez-se necessária a simulação de fraude do leite e, para tanto, adicionou-se porcentagens previamente estabelecidas (1, 2, 5, 10 e 20%) de soro industrial a leites crú autênticos. A mistura leite e soro assim obtidas, foram imediatamente submetidas ao teste.

- *LEITE PASTEURIZADO:* Trabalhou-se com 2 tipos de leite pasteurizado, dependendo do objetivo. Quando o objetivo era obter resultados para elaboração de uma distribuição amostral, o leite pasteurizado (tipo B ou C) foi coletado nas usinas beneficiadoras

da região de Barretos/SP, em suas embalagens originais e comerciais, obedecendo-se seus prazos de validade. Quando o objetivo era comparar leite crú com leite pasteurizado, este foi obtido diretamente das torneiras de coleta dos pasteurizadores à placas.

- *ÁCIDO SIÁLICO:* O produto sintético foi adquirido do Laboratório Sigma com a finalidade de construir as curvas-padrão.

O sal foi hidratado com água destilada deionizada, elaborando-se uma solução estoque na concentração de 294 µg de ácido siálico/ml. Parte desta solução estoque foi congelada em tubos de ensaio hermeticamente fechados para elaboração posterior de outras curvas-padrão.

## 3. MÉTODOS

### 3.1. *ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DA NINIDRINA ÁCIDA*

À cada 10 ml de amostra de leite foram acrescidos, sob agitação, 10 ml de TCA 24%. Após homogeneização e repouso de 30 minutos, a mistura foi filtrada. Tomou-se 10 ml desse filtrado TCA em tubos de centrífuga e adicionou-se 1 ml de PTA 20%. Esta nova mistura foi submetida à uma centrifugacão de 3.500 rpm (ou 2000 g) por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado

cuidadosamente, evitando-se perda do sedimento que foi dispersado com ajuda de bastão de vidro em 4 ml de álcool etílico 95%. O bastão foi enxaguado com 2 ml de álcool etílico. Procedeu-se à nova centrifugação de 3500 rpm durante 10 minutos. Novamente utilizou-se somente o precipitado, ao qual foi adicionado 2 ml de ácido acético glacial e 1 ml de ninidrina ácida. Após homogeneização, foi submetido à banho-maria fervente, por exatos 10 minutos. Houve desenvolvimento de cor, variando do amarelo claro ao marrom-amarelado. A solução de mistura foi então resfriada à temperatura ambiente, em banho de água gelada e levada à leitura da absorvância espectrofotométrica, no comprimento de onda de 470 nm. As leituras foram transformadas em concentração (µg NANA/ml amostra), utilizando-se a curva padrão previamente elaborada com ácido siálico puro.

### 3.2. *CURVA PADRÃO*

Elaborou-se 2 curvas padrão em periodos distintos e ambas partiram da mesma solução estoque de 294 µg de ácido siálico/ml.

Diluiu-se com água destilada a solução estoque à uma solução de trabalho de 98 µg NANA/ml, de onde foram tomadas 10 alíquotas, em duplicatas, sendo a inicial de 100 µl e crescentes de 100 µl cada, até atingir 1000 µl, representando concentrações que variaram de 9.8 à 98 µg NANA. Todas as

alíquotas tiveram seus volumes igualados, com água destilada, até o total de 1 ml. Acrescentou-se à cada tubo 1 ml de ácido acético glacial e 1 ml de ninidrina ácida. Após banho-maria fervente ,por 10 minutos, e resfriamento, procedeu-se à uma corrida espectrofotométrica, na faixa de 400 a 600 nm, identificando-se que a absorção máxima ocorreu no comprimento de onda de 470 nm.

Estabelecido o comprimento de onda ideal, efetuou-se a leitura da absorvância à diferentes concentrações para a confecção da curva padrão.

### 3.3. *MÉTODO OFICIAL SEGUNDO PORTARIA Nº 124 /MA*

Adicionar 25 ml de TCA 24% à 25 ml da amostra de leite, sob agitação. Deixar em repouso por 30 minutos e filtrar. Transferir para o tubo de centrífuga, 25 ml do filtrado, adicionar 1 ml de PTA 20%, misturar bem, deixar em repouso por 10 minutos e centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm. Descartar o sobrenadante líquido e lavar o sedimento com 4 ml de etanol a 95% usando um bastão de vidro para dispersar o precipitado. Lavar o bastão de vidro com 1 a 2 ml de etanol e centrifugar novamente por 10 minutos a 3.000 rpm. Descartar o etanol, evitando perda de precipitado e secar o sedimento por 35-40ºC por 30 minutos.

Adicionar ao sedimento seco, 3 ml de ácido sulfúrico 0,1N usando um bastão de vidro para dispersá-lo. Lavar o bastão de vidro com 1ml de ácido sulfúrico 0.1 N, recolher a

solução de lavagem, fechar o tubo de centrífuga e incubar em banho-maria rigorosamente à 80ºC por 40 minutos.

Após resfriar à temperatura ambiente, pipetar 2ml do sobrenadante e transferir para tubo reagente com tampa rosqueável, cuidando para não arrastar o precipitado. Adicionar 0,5 ml do regente de Ehrlich preparado no momento do uso. Fechar o tubo e colocá-lo em água fervente por 30 minutos; resfriar em banho de gelo até a temperatura ambiente. O nível da água no banho-maria fervente deve ser inferior ao da tampa do tubo, para evitar contaminação. O desenvolvimento de cor púrpura indica a presença de soro na amostra.

A cor púrpura pode ser mais evidenciada pela adição de 2 ml de acetona e agitação do tubo. Teste negativo desenvolve coloração amarelo palha (pálido) à ligeiramente rosa. Pode ser realizada leitura espectrofotométrica à 565 nm.

### 3.4. *VARIÁVEIS ESTUDADAS*

- *PRECIPITAÇÃO:* Para o estudo desta variável fez-se precipitações individuais, isto é, da mesma amostra de leite tomaram-se 8 alíquotas de 10 ml que receberam , sob agitação, 10 ml de TCA 24% cada uma. Após 30 minutos, cada alíquota foi filtrada, seguindo separadamente toda a metodologia. Os resultados foram comparados com os obtidos quando se misturou 80 ml do leite à 80 ml de TCA 24%. Após repouso de 30 minutos e filtração, tomou-se 8

alíquotas de 10 ml do filtrado em TCA e à partir deste ponto seguiu-se normalmente a técnica de YAO et alii (1989).

- *PASTEURIZAÇÃO:* Para a comparação do teor de ácido siálico em leite crú e leite pasteurizado, coletou-se amostras de leite crú junto a tanques reguladores de nível constante (TRNC) de pasteurizadores à placas. Esperou-se o tempo necessário para o percurso do leite no equipamento (variou de 2 à 2.5 minutos) e procedeu-se a tomada de amostra do leite pasteurizado , na torneira de coleta do pasteurizador, assegurando assim que as análises correspondessem ao mesmo leite, em seu estado crú e pasteurizado.

- *CONDIÇÕES DE TRANSPORTE:* Para se verificar a ocorrência de variações entre o leite recém-ordenhado e o leite que chega às plataformas, tomou-se amostras nas fazendas do leite recém ordenhado, que foi levado ao laboratório, imediatamente. Os latões, devidamente identificados na fazenda foram transportados normalmente, pelas linhas de leite, até o estabelecimento receptor. Ao chegarem nas plataformas, entre 10 e 12 horas, nova coleta de amostras foi efetuada nos mesmos latões. Os resultados das duas coletas foram comparados.

## 4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Parte dos resultados foram submetidos à análises de variância e ao teste de Tukey (comparação de médias),

utilizando-se o programa computacional ESTAT, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da UNESP - Campus de Jaboticabal. Utilizou-se também análises de blocos casualizados, ajustando-se, em alguns casos, análises de regressão das médias obtidas.

As distribuições amostrais analisadas pelo programa computadorizado ESTATGRAPH, foram ajustadas à uma curva de distribuição normal e ao método "Box and Whisker Plot".

# V. Resultados e Discussão

## 1. ADAPTAÇÃO DO MÉTODO

### *1.1 DEFINIÇÃO DO MÉTODO*

Todos os métodos para a determinação de ácido siálico o fazem passando pela etapa de isolamento da glicoproteína ou, mais especificamente, o GMP onde se encontra o NANA. Grande parte dos métodos usam a hidrólise ácida para separar o ácido siálico do GMP.

Em síntese, nos métodos clássicos, os passos para a determinação de ácido siálico seguem praticamente a mesma ordem técnica. Filtra-se uma mistura de leite e TCA 24%, em volumes iguais; ao filtrado acrescenta-se PTA 20% que, após centrifugação, fornecerá um resíduo. Esse resíduo, convenientemente lavado com etanol para a eliminação da lactose, é submetido à hidrólise ácida à quente para a liberação do ácido siálico. A complexação com cromóforos específicos produz um desenvolvimento de cor que pode ser medido, levando à

determinação do teor de NANA.

Na técnica descrita por YAO et alii (1989), para a determinação da concentração de ácido siálico em sialoglicoproteínas contidas no líquido ascítico formado pela introdução de células tumorais na região peritoneal de ratos, alguns pontos foram passíveis de maior atenção, quais sejam: 1º) A não necessidade de realizar-se a hidrólise ácida à quente. 2º) O desenvolvimento da cor ocorrendo mais rapidamente. Esses dois fatos abreviam praticamente à metade, o tempo de execução da prova. 3º) A especificidade do método para sialoglicoproteínas, uma vez que vários dos possíveis interferentes foram testados (proteínas, peptídeos, aminoácidos e açúcares). 4º) O elevado coeficiente de absortividade molar obtido para o ácido siálico puro.

Dentro dos propósitos de adaptação da técnica a leite e derivados, vários estudos preliminares tornaram-se necessários. Dentre os métodos expostos para precipitação protéica, optou-se pelo T.C.A. 24%, em quantidades iguais ao leite, a fim de obter-se uma concentração de 12% na solução final. Como o interesse primordial estava no isolamento do GMP, peptídeo de 6755 Da, lançou-se mão do PTA 20%, recomendado por WOLFSCHOON- POMBO & PINTO (1985), a fim de se conseguir um subfracionamento da fração solúvel em TCA 24%. Decididos esses pontos, fez-se ainda pequenos ajustes quantitativos.

WOLFSCHOON-POMBO & PINTO (1985) discutindo sobre a tomada de alíquota para o método que estavam adaptando (p-dimetilaminobenzaldeído), e que mais tarde foi oficializado, verificou que 25 ml do filtrado TCA apresentava uma apreciável quantidade de GMP. Usando 10 ml do filtrado, a sensibilidade do método era ligeiramente reduzida. Com a finalidade de obter um volume sufuciente de filtrado, recomendou a mistura de 25 ml de leite com 25 ml de TCA 24%.

Partindo-se de 25 ml de leite, conforme a metodologia oficial e omitindo-se a hidrólise ácida à quente, verificou-se que a quantidade de resíduo obtida, após execução da técnica com o reagente de GAITONDE (ninidrina ácida), promoveu uma intensidade de cor muito elevada, fazendo-se necessária a sua diluição em etanol para a realização da leitura espectrofotométrica.

Esses resultados conflitantes, provavelmente, deram-se à maior especificidade da ninidrina ácida para com as sialoglicoproteínas que o cromóforo usado no método oficial e por WOLFSCHOON-POMBO et alii (1985) , além da elevada absortividade molar, refletindo-se diretamente na leitura espectrofotométrica, isto é, na interação com a ninidrina ácida, menores quantidades de ácido siálico são suficientes para conferir cor e obter-se uma leitura.

Em vários ensaios preliminares, para adaptação da

metodologia de YAO et alii (1989), usando diversos volumes de leite, chegou-se à conclusão que 10 ml do filtrado seriam suficientes para executar a análise, uma vez que atendia a LEI DE BEER, isto é, o ideal para a leitura espectrofotométrica de uma solução é que a transmitância seja de 37% (correspondendo a uma absorvância de 0,4343) , mas o erro relativo numa análise, não será muito importante num intervalo de transmitância entre 15 e 65%, ou seja, absorvância entre 0.2 e 0.8. O volume de 10 ml de amostra resulta numa absorvância, a 470 nm, nesse intervalo recomendado por BEER (EWING, 1977).

Esse menor volume do filtrado acarreta também menor volume da amostra e, consequentemente, menor gasto em reagentes como o TCA e somente a utilização de vidrarias comuns em laboratórios industriais, além do que, uma média próxima ao limite inferior da absorvância recomendada, facilitaria a leitura dentro do mesmo intervalo (BEER), caso uma amostra de leite esteja fraudada com soro de queijo.

Em seguida, houve a necessidade de verificar-se a influência do volume do PTA, uma vez que, no método oficial, para cada 25 ml de filtrado de TCA utiliza-se 1.0 ml de PTA 20%. Como a técnica aqui proposta parte do uso de 10 ml de filtrado, vários ensaios foram realizados com esse objetivo. Em 14 amostras de leite foram utilizados 0.5 e 1.0 ml de PTA 20%. Os resultados encontrados estão na Tabela 09 e os mesmos foram analisados em delineamento de blocos casualizados.

Tabela 09. **Comparação da utilização de quantidades diferentes de ácido fosfotúngstico 20% em amostras de leite e em misturas de leite e soro. Quadro em Absorvâncias.**

| Amostra | P T A | | $\bar{X}$ | CV % |
|---|---|---|---|---|
| | 0,5 ml | 1,0 ml | | |
| 1 | 0,135 | 0,133 | 0,134 | 1,06 |
| 2 | 0,142 | 0,151 | 0,152 | 0,93 |
| 3 | 0,162 | 0,146 | 0,154 | 7,35 |
| 4 | 0,169 | 0,168 | 0,168 | 0,00 |
| 5 | 0,187 | 0,187 | 0,187 | 0,00 |
| 6 | 0,222 | 0,194 | 0,208 | 9,52 |
| 7 | 0,267 | 0,258 | 0,262 | 2,43 |
| 8 | 0,325 | 0,338 | 0,331 | 2,78 |
| 9 | 1,750 | 1,722 | 1,736 | 1,14 |
| 10 | 0,152 | 0,174 | 0,163 | 9,54 |
| 11 | 0,543 | 0,560 | 0,551 | 2,18 |
| 12 | 0,132 | 0,109 | 0,120 | 13,56 |
| 13 | 0,230 | 0,211 | 0,220 | 6,11 |
| 14 | 1,868 | 1,654 | 1,761 | 8,60 |
| F = 1,64 | | NS | | |

Legenda: PTA - Ácido Fosfotúngstico 20%
X - Média de Absorvância
CV - Coeficiente de Variação
NS - Não Significativo ($P < 0,05$)

Os resultados apontaram que 93% dos coeficientes de variação foram menores que 10% ( CV< 5% para 57% das amostras, 5<CV<10 para 36% das amostras), enquanto que apenas 1 amostra (7.0%) acusou CV > 10%. Pela análise de variância pode-se afirmar que não houve diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, entre os tratamentos.

Em vista desses dados e considerando a facilidade de manuseio laboratorial resolveu-se, como medida de padronização, utilizar sempre 1.0 ml de PTA 20% para 10.0 ml de

filtrado TCA.

Como mencionado anteriormente, açucares como a galactose, frutose, manose, manitol, N-acetil-D-glucosamine, N-acetil-D-galactosamine e outros, foram testados por YAO & UBUKA (1987), sem apresentar alterações na prova, apesar de que, em relação ao leite, interessa apenas a lactose. Então, submeteu-se uma solução de lactose 5% ao método da ninidrina ácida, obtendo-se uma absorvância, a 470 nm, de 0,321. Para evitar-se a interferência da lactose na prova, procurou-se eliminá-la, lavando-se o resíduo obtido com etanol 95%, conforme metodologia clássica e recomendação do método oficial.

O resíduo livre de lactose foi então submetido à metodologia recomendada por YAO et alii (1989).

Em decorrência da capacidade das cubetas do espectrofotômetro, foi necessário atingir um volume de 3 ml da solução de mistura e para tanto acrescentou-se 2 ml de ácido acético glacial e 1 ml da solução de ninidrina ácida que é o reagente cromogênico da reação. A solução final assim formada, sob forte aquecimento (banho-maria fervente), em exatos 10 minutos, desenvolve uma coloração que pode ser lida em comprimento de onda de luz visível.

Quanto às interferências, citadas por GAITONDE (1967) e YAO & UBUKA (1987), que ocorrem pela presença da cisteína, cistina e triptofano, pode-se observar que no GMP do

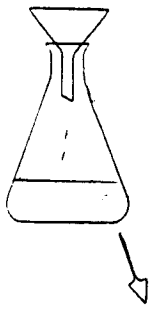
leite esses aminoácidos estão ausentes, além do que, aminoácidos e peptídeos livres, possívelmente presentes na fração nitrogenada solúvel em TCA, são eliminados quando da precipitação com PTA, uma vez que permanecem solúveis e são descartados.

Sabe-se que a ninidrina reage quimicamente com os aminoácidos, interagindo com o grupo $NH_2$, o que permite a sua determinação colorimétrica. A reação ocorre à quente e em pH 4,55 e conduz à formação de complexos de cor azulada ou violeta. Em pH < 4 ou > 6 esta reação não produz cor (CHEFTEL et alii, 1989). Isto garante maior segurança sobre a especificidade da reação para ácido siálico, pois com o reagente de GAITONDE, há desenvolvimento de coloração variando do amarelo ao marron, em condições de pH bem abaixo de 4.0, mais especificamente 1,6.

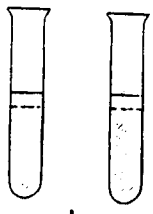
GAITONDE (1967) recomenda que a ninidrina ácida seja preparada antes do uso, mas não sendo um reagente de fácil preparação, pela dificuldade de dissolução dos cristais de ninidrina, e que demanda 30 a 40 minutos, para que isto ocorra, fez-se alguns testes para verificar a vida útil desse reagente quando armazenado em frasco âmbar, bem vedado e mantido sob refrigeração. Em função da pequena variação observada, optou-se por preparar o reagente semanalmente, ou no máximo, quinzenalmente, estocando-o nas condições descritas.

Com todos esses aspectos, citados acima, bem padronizados, a técnica foi então definida conforme Figura 07.

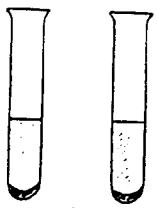
1. Quantidades iguais de leite e solução TCA 24%.
   Agitação. Repouso por 30 minutos.



2. Filtração.

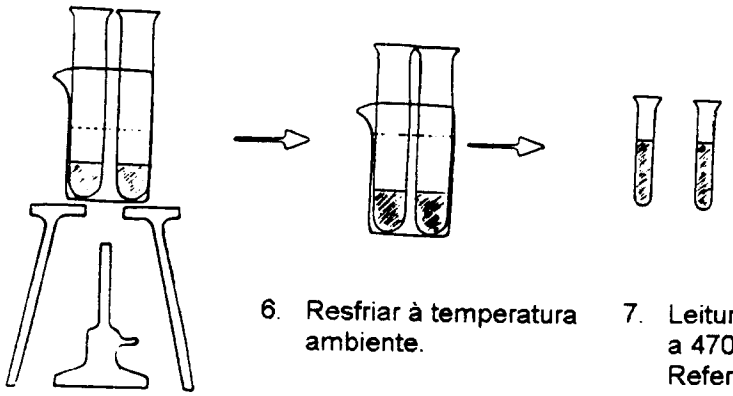


3. Duplicatas: 10 ml filtrado + 1 ml ácido Fosfotúngstico 20%.
   Centrifugar a 3500 rpm / 10 minutos.
   Descartar sobrenadante.



4. Resíduo + 6 ml de etanol (Redissolver com bastão).
   Centrifugar a 3500 rpm / 10 minutos.
   Descartar o sobrenadante.

5. Adicionar ao resíduo seco 2 ml de ácido acético glacial e
   1 ml do reagente de ninidrina ácida.
   Aquecer em banho-maria fervente (100°C / 10 minutos).



6. Resfriar à temperatura ambiente.

7. Leitura espectrofotométrica a 470 nm contra branco.
   Referir à curva padrão.

5.

Figura 07. Determinação de Ácido Siálico (NANA) em leite.

## 1.2. *ESTUDO DE PRECIPITAÇÃO*

Na execução da prova, as alíquotas, para as duplicatas ou triplicatas, poderiam ser tomadas do próprio leite ou do filtrado TCA. A fim de avaliar uma possível alteração nos resultados, comparou-se essas duas maneiras de se tomar alíquotas, denominando-as de precipitação individual e conjunta. Na precipitação individual, as alíquotas são tomadas da amostra de leite e na precipitação conjunta são tomadas do filtrado TCA. Para este teste utilizou-se 6 amostras diferentes de leite.

Cada amostra de leite foi submetida às duas formas de precipitação (individual e conjunta). Para cada precipitação individual, tomou-se 8 alíquotas de 10 ml de leite que receberam separadamente 10 ml de TCA 24% . Para cada precipitação conjunta tomou-se 60 ml de leite acrescidos de 60 ml de TCA 24%. Todas as misturas foram homogeneizadas, repousaram 30 minutos e foram filtradas, obtendo-se assim, para cada precipitação individual, 8 filtrados distintos e, para cada precipitação conjunta, um filtrado único de onde se retirou 8 alíquotas de 10 ml cada. Portanto para cada amostra de leite, seguiram o teste, normalmente, 16 alíquotas de 10 ml de filtrado TCA. Os resultados encontrados foram submetidos à análises de variância e estão expostos na Tabela 10.

Segundo os conceitos estatísticos o Quadrado Médio de Tratamentos (QMT) mede ao mesmo tempo as diferenças entre os

## Tabela 10. Comparação entre tipos de precipitação.

| Amostra | PPT | REPETIÇÕES | | | | | | | | $\bar{X}$ | F | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | I | 0,148 | 0,153 | 0,137 | 0,138 | 0,151 | 0,116 | 0,179 | 0,118 | 0,144 | 0,27 | NS |
| | C | 0,160 | 0,172 | 0,148 | 0,177 | 0,129 | 0,164 | 0,126 | 0,118 | 0,149 | | |
| 2 | I | 0,104 | 0,105 | 0,104 | 0,092 | 0,077 | 0,092 | 0,079 | 0,071 | 0,090 | 1,08 | NS |
| | C | 0,075 | 0,104 | 0,092 | 0,118 | 0,098 | 0,087 | 0,099 | 0,106 | 0,097 | | |
| 3 | I | 0,098 | 0,094 | 0,102 | 0,110 | 0,123 | 0,097 | 0,129 | 0,120 | 0,109 | 0,69 | NS |
| | C | 0,118 | 0,108 | 0,095 | 0,121 | 0,119 | 0,113 | 0,123 | 0,114 | 0,114 | | |
| 4 | I | 0,086 | 0,079 | 0,098 | 0,098 | 0,092 | 0,105 | 0,071 | 0,091 | 0,090 | 0,18 | NS |
| | C | 0,104 | 0,101 | 0,087 | 0,085 | 0,096 | 0,087 | 0,085 | - | 0,092 | | |
| 5 | I | 0,286 | 0,240 | 0,243 | - | - | - | - | - | 0,272 | 5,81 | NS |
| | C | 0,217 | 0,234 | 0,229 | 0,212 | - | - | - | - | 0,223 | | |
| 6 | I | 0,125 | 0,153 | 0,137 | 0,117 | - | - | - | - | 0,133 | 0,49 | NS |
| | C | 0,116 | 0,141 | 0,116 | - | - | - | - | - | 0,125 | | |

Legenda : PPT - Tipos de Precipitação
I - Precipitação Individual
NS - Não Significativo ($P < 0,05$)
$\bar{X}$ - Média Aritmética
C - Precipitação Conjunta

tratamentos e o efeito do acaso que está sempre presente, e o Quadrado Médio do Residuo (QMR) mede o efeito do acaso. O quociente entre o QMT e o QMR determina o valor de F que estará tão mais próximo de 1,0 quanto menor for o efeito dos tratamentos aplicados. Havendo efeito dos tratamentos, espera-se que o valor de F seja maior que 1.0, uma vez que o numerador encerra, além da variação do acaso, a variação dos tratamentos,

ao passo que o denominador encerra apenas a variação do acaso. Para um julgamento objetivo desse valor de F, consulta-se tabelas apropriadas onde se entra com os números de graus de liberdade (G.L.) do QMT e do QMR, para probabilidade de 1 ou 5%. Isto significa dizer que, sendo verdadeira a *hipótese de nulidade*, isto é, na ausência de efeitos de tratamentos, só em 1 ou 5% dos casos, a análise de variância desse ensaio, daria o valor de F acima do encontrado na tabela; logo em 99 ou 95% dos casos, o valor de F obtido, deveria ser inferior ao da tabela. Quando o valor de F obtido no experimento for inferior ao limite de 1 ou 5%, considera-se que o resultado não foi significativo, isto é, que não se comprovaram diferenças entre os tratamentos (GOMES, 1984).

Como pode ser observado na Tabela 10, todos os valores de F obtidos nos ensaios foram inferiores aos indicados nas tabelas , tanto para 1 quanto para 5% de probabilidades, ou seja, mostraram-se não significativos, concluindo-se, portanto, que não há diferenças entre os tratamentos analisados.

Não havendo diferença entre os tratamentos estudados, pode-se afirmar que não há diferença estatística significativa entre as duas maneiras de se efetuar a precipitação do leite, decidindo-se pela menos trabalhosa, ou seja, precipitação conjunta com a devida tomada de duplicatas ou triplicatas do filtrado TCA.

### 1.3. *CURVA PADRÃO*

Foram realizadas duas curvas padrão distintas, partindo-se de uma solução de ácido siálico puro, na concentração de 98 µg de NANA/ml. Tomou-se alíquotas crescentes em 100 µl, obtendo-se a faixa de 100 à 1000 µl desta solução, completadas para 1,0 ml com água destilada deionizada.

As soluções de ácido siálico assim elaboradas foram acrescidas de ácido acético glacial e ninidrina ácida, perfazendo um total de 3,0 ml de solução de mistura, conforme Tabela 11.

**Tabela 11. Quadro Demonstrativo da construção da Curva Padrão para o método da ninidrina ácida.**

| Pontos da Curva | Solução Ác.Siálico (µl) * | Água Dest. Deionizada (µl) | Ác.Acético Glacial (ml) | Ninidrina Ácida (ml) | Volume Final (ml) | Conc.Final Ác.Siálico (µg) ** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 100 | 900 | 1 | 1 | 3 | 9.8 |
| 2 | 200 | 800 | 1 | 1 | 3 | 19.6 |
| 3 | 300 | 700 | 1 | 1 | 3 | 29.4 |
| 4 | 400 | 600 | 1 | 1 | 3 | 39.2 |
| 5 | 500 | 500 | 1 | 1 | 3 | 49.0 |
| 6 | 600 | 400 | 1 | 1 | 3 | 58.8 |
| 7 | 700 | 300 | 1 | 1 | 3 | 68.6 |
| 8 | 800 | 200 | 1 | 1 | 3 | 78.4 |
| 9 | 900 | 100 | 1 | 1 | 3 | 88.2 |
| 10 | 1000 | 0 | 1 | 1 | 3 | 98.0 |

Obs.: * Ácido Siálico a 98 µg/ml ** Ácido Siálico na amostra

O valor de r , obtido por regressão linear, para as duas curvas padrão foram, respectivamente, 0.9984 e 0.9999.

Obtendo-se a média das absorvâncias das duas curvas padrão (Tabela 12) e calculando-se a sua regressão linear, tem-se o valor de r igual a 0.9996 com a equação da reta y = a + bx sendo a = 0,0201 e b = 0,0109 (Figura 08).

**Tabela 12. Leitura espectrofotométrica a 470 nm dos Padrões e respectivas médias. Equação da reta das determinações.**

| Concentr. Ác. Siálico µg/amostra | CURVAS PADRÃO Absorvâncias | | $\bar{X}$ |
|---|---|---|---|
| | I | II | |
| 9,8 | 0,111 | 0,122 | 0, 117 |
| 19,6 | 0,234 | 0,239 | 0, 237 |
| 29,4 | 0,345 | 0,351 | 0, 348 |
| 39,2 | 0,451 | 0,460 | 0, 456 |
| 49,0 | 0,499 | 0,563 | 0, 531 |
| 58,8 | 0,654 | 0,680 | 0, 667 |
| 68,6 | 0,748 | 0,783 | 0, 766 |
| 78,4 | 0,857 | 0,890 | 0, 874 |
| 88,2 | 0,940 | 1,008 | 0, 974 |
| 98,0 | 1,037 | 1,130 | 1, 084 |
| r | 0,9984 | 0,9999 | 0, 9996 |
| a | 0,0249 | 0,0147 | 0, 0201 |
| b | 0,0104 | 0,0113 | 0, 0109 |

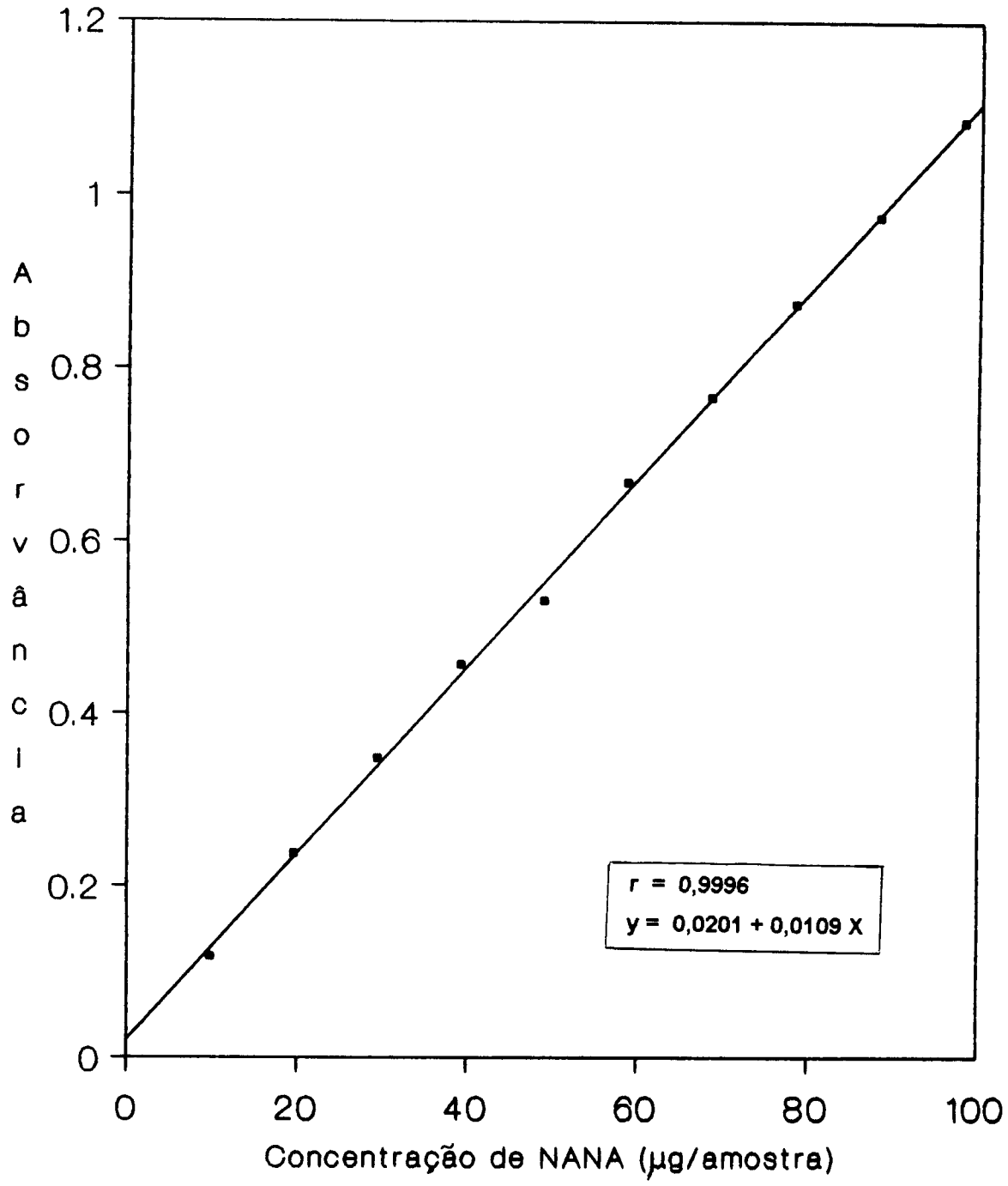



Figura 08. Curva Padrão de Ácido Siálico para o método da ninidrina ácida. (Média de 2 curvas).

A absortividade molar calculada para esta curva padrão média foi de $1,06 \times 10^4$ enquanto que a encontrada por YAO & UBUKA (1987) foi de $6.64 \times 10^3$. Essas diferenças talvez sejam devidas a dois fatores. O primeiro seria o grau de pureza do ácido siálico que, no presente caso, foi de 95%, porém para confecção das soluções das curvas padrão os cálculos foram reportados para 100%. YAO & UBUKA (1987) não fazem menção a esse fato ( a SIGMA possui uma série de Ácidos Siálicos, de diferentes fontes, variando entre 60 e 98% de pureza). O segundo fator, provavelmente, seria o tempo real de aquecimento. YAO & UBUKA (1987) extipulam exatos 10 minutos em banho-maria fervente. Na adaptação da técnica, os tubos de ensaio com as soluções foram colocados em becker com água em temperatura ambiente e este conjunto é que foi levado ao aquecimento, levando as soluções a se aquecerem juntamente com a água do banho, sendo que o tempo somente começou a ser contado efetivamente a partir da fervura, o que, possivelmente, eleva o tempo global de aquecimento.

Em corridas espectrofotométricas conseguiu-se reproduzir os dados de YAO & UBUKA (1987), ou seja, obter a absorvância máxima, no comprimento de onda de 470 nm, como pode ser visto na Figura 09. Numa melhor visualização ponto à ponto, ao redor da região de máxima absorvância (Figura 10) certifica-se que mesmo a variabilidade de 2%, normal entre diferentes aparelhos fotométricos, não altera o comprimento de onda ótimo para leitura.

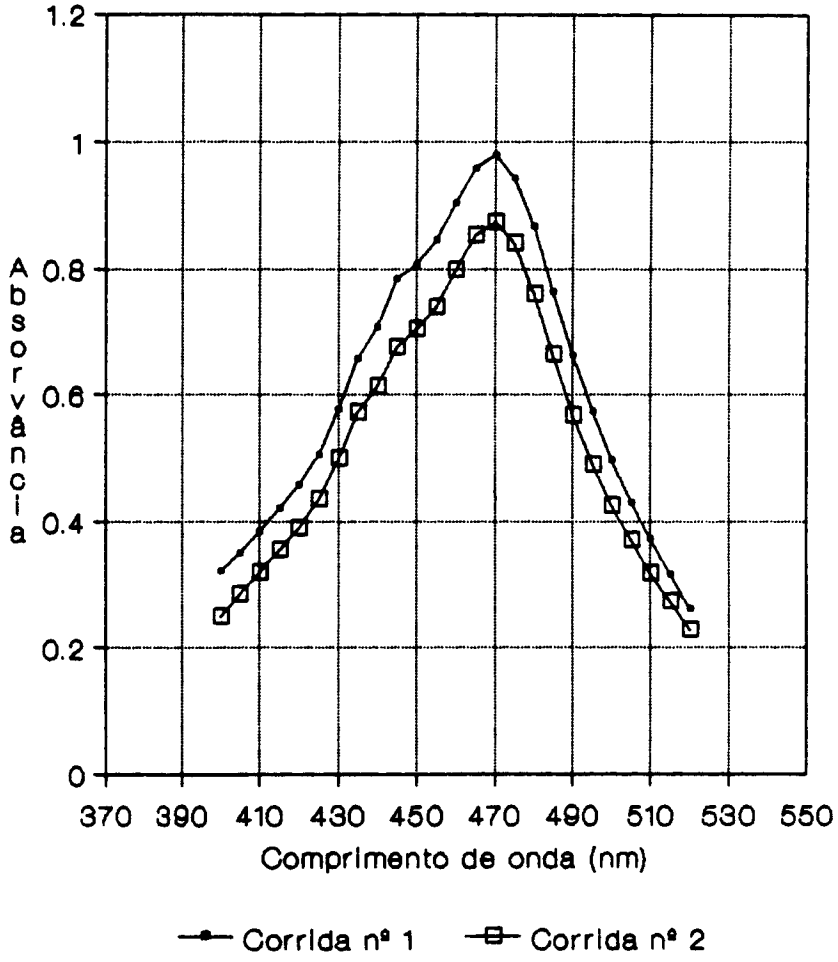



Figura 09. Corridas Espectrofotométricas para determinação de ácido siálico pelo método da ninidrina ácida.

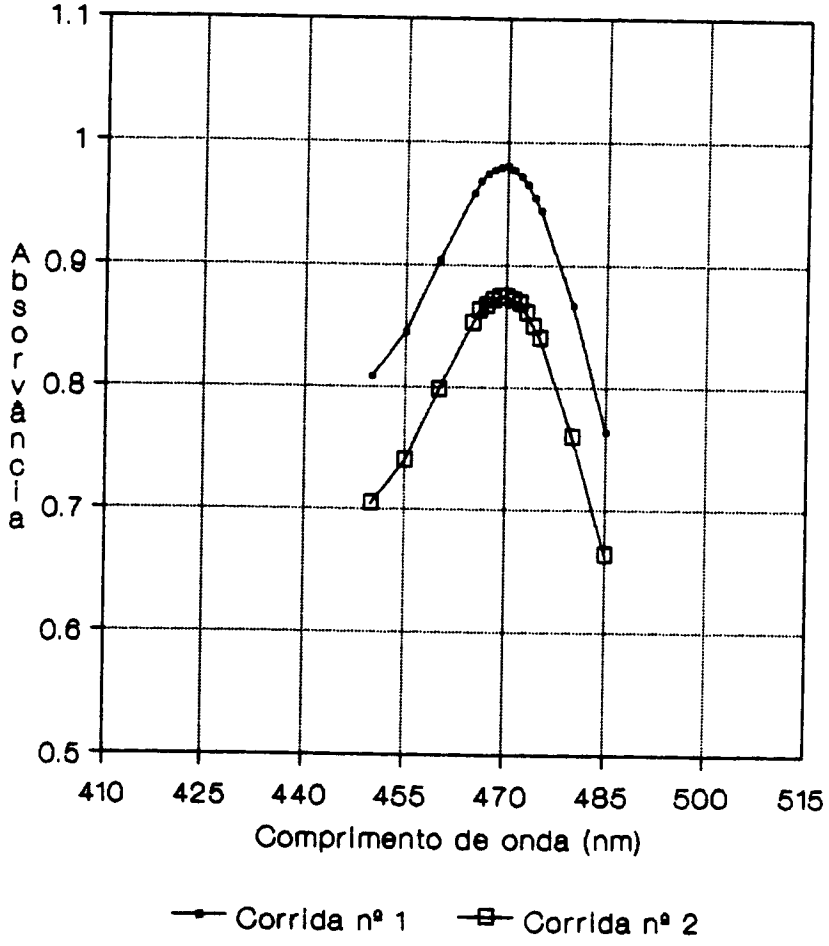



Figura 10. Variação ponto a ponto na proximidade do comprimento de onda de leitura para determinação de ácido siálico pelo método da ninidrina ácida.

YAO & UBUKA (1987) encontraram uma linearidade na curva padrão na faixa de 5 a 500 nmol de NANA/0.9 ml de mistura de reação. Em 1989, YAO et alii obtiveram uma curva padrão que foi linear na faixa de 20 μg a 3 mg de proteína/3ml de mistura de reação. No presente trabalho obteve-se, para 3 ml de solução final, uma linearidade entre 9,8 a 98,0 μg de NANA, que foram as concentrações testadas e que, nessas condições enquadraram-se perfeitamente na faixa de maior exatidão fotométrica para as leituras de absorvância, em obediência à Lei de Beer.

## *1.4. ESTUDO DOS PARÂMETROS DE PRECISÃO DO MÉTODO*

### *1.4.1. Repetibilidade da Prova*

A repetibilidade descreve a precisão de um dado método no que se refere a testes desenvolvidos em materiais idênticos, em pequenos intervalos, num único laboratório, com mesmo operador e mesmos equipamentos. Para se mensurar essa precisão ou repetibilidade determina-se o valor médio dos resultados de uma série de análises. Para condições de ótima repetibilidade, o coeficiente de variação desses valores deve ser menor ou igual a 5%. (TOLLE et alii, 1981). Para metodologias que analisam materiais biológicos considera-se como boa uma variação de até 10%. Sabe-se que o leite é um material biológico muito heterogêneo, decorrente da variabilidade individual da

fêmea produtora, das diferenças sazonais, das diferenças de alimentação, diferenças entre raças, número de parição , etc.

Definido o método fez-se necessário conhecer a sua repetibilidade. Para tanto, analisaram-se 31 amostras de leite em duplicatas e 13 amostras em quadruplicatas.

Das 31 amostras, 17 (54.8%), apresentaram um coeficiente de variação menor que 5%, 9(29%) com 5< CV <10% e 5 (16.2%) com CV>10% entre as duplicatas. Portanto, 83.8% das amostras tiveram uma variação menor que 10% (Tabela 13).

Das 13 amostras, as quadruplicatas apresentaram um CV < 5% em 5 amostras (38.46%), 5 < CV < 10 em 5 amostras (38.46%) e CV > 10% em 3 amostras (23.1%). O total de amostras que se enquadrou numa variação menor que 10% foi de 76.9%. Possivelmente, o número menor de amostras com menos de 10% de variação nas quadruplicatas seja explicado pelo número menor de amostras de leite submetidas a este tratamento (Tabela 14).

A variabilidade das repetições em duplicatas para a mesma amostra de leite foi de 8.08% enquanto que para as quadruplicatas foi de 7.54% .

Pode-se dizer que a variabilidade do método para duplicatas e/ou quadruplicatas é praticamente a mesma, ou seja, para a mesma amostra de leite, a variação em relação à media é, aproximadamente, de 8%.

Tabela 13. Teste de Repetibilidade do método da ninidrina ácida para duplicatas.

| Amostra | Absorvância | | $\bar{X}$ | s | C V % |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | | | |
| 1 | 0,132 | 0,134 | 0,133 | 0,00141 | 1,06 |
| 2 | 0,147 | 0,147 | 0,147 | 0 | 0,00 |
| 3 | 0,149 | 0,177 | 0,163 | 0,01979 | 12,14 |
| 4 | 0,168 | 0,163 | 0,166 | 0,00354 | 2,14 |
| 5 | 0,147 | 0,165 | 0,156 | 0,01273 | 8,16 |
| 6 | 0,132 | 0,132 | 0,132 | 0 | 0,00 |
| 7 | 0,133 | 0,154 | 0,144 | 0,01485 | 10,35 |
| 8 | 0,202 | 0,238 | 0,220 | 0,02546 | 11,57 |
| 9 | 0,244 | 0,258 | 0,251 | 0,00989 | 3,94 |
| 10 | 0,121 | 0,125 | 0,123 | 0,00283 | 2,30 |
| 11 | 0,163 | 0,176 | 0,170 | 0,00919 | 5,42 |
| 12 | 0,174 | 0,183 | 0,179 | 0,00636 | 3,56 |
| 13 | 0,153 | 0,137 | 0,145 | 0,01131 | 7,80 |
| 14 | 0,185 | 0,164 | 0,175 | 0,01485 | 8,51 |
| 15 | 0,240 | 0,249 | 0,245 | 0,00636 | 2,60 |
| 16 | 0,201 | 0,201 | 0,201 | 0 | 0,00 |
| 17 | 0,181 | 0,202 | 0,192 | 0,01485 | 7,75 |
| 18 | 0,199 | 0,186 | 0,193 | 0,00919 | 4,77 |
| 19 | 0,135 | 0,135 | 0,135 | 0 | 0,00 |
| 20 | 0,174 | 0,134 | 0,154 | 0,02828 | 18,36 |
| 21 | 0,201 | 0,184 | 0,193 | 0,01202 | 6,24 |
| 22 | 0,103 | 0,100 | 0,102 | 0,00212 | 2,09 |
| 23 | 0,129 | 0,128 | 0,129 | 0,00071 | 0,55 |
| 24 | 0,176 | 0,160 | 0,168 | 0,01131 | 6,73 |
| 25 | 0,241 | 0,237 | 0,239 | 0,00283 | 1,18 |
| 26 | 0,424 | 0,373 | 0,399 | 0,03606 | 9,05 |
| 27 | 0,147 | 0,170 | 0,159 | 0,01626 | 10,26 |
| 28 | 0,082 | 0,088 | 0,085 | 0,00424 | 4,99 |
| 29 | 0,083 | 0,085 | 0,084 | 0,00141 | 1,68 |
| 30 | 0,076 | 0,077 | 0,077 | 0,00071 | 0,93 |
| 31 | 0,161 | 0,125 | 0,143 | 0,02546 | 17,80 |
| ANÁLISE DE VARIÂNCIA : | | | CV = | 8,08 % | |

Legenda : $\bar{X}$ - Média de Absorvância
s - Desvio Padrão
CV - Coeficiente de Variação

Tabela 14. Teste de Repetibilidade do método da ninidrina ácida para quadruplicatas.

| Amostra | Absorvância | | | | $\bar{X}$ | s | CV % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| 1 | 0,189 | 0,191 | 0,194 | 0,174 | 0,187 | 0,00891 | 4,76 |
| 2 | 0,174 | 0,217 | 0,176 | 0,195 | 0,191 | 0,02004 | 10,52 |
| 3 | 0,201 | 0,200 | 0,189 | 0,166 | 0,189 | 0,01627 | 8,61 |
| 4 | 0,257 | 0,275 | 0,262 | 0,215 | 0,252 | 0,02597 | 10,30 |
| 5 | 0,250 | 0,232 | 0,253 | 0,233 | 0,242 | 0,01104 | 4,56 |
| 6 | 0,237 | 0,217 | 0,237 | 0,233 | 0,231 | 0,00952 | 4,12 |
| 7 | 0,202 | 0,235 | 0,240 | 0,230 | 0,227 | 0,01699 | 7,49 |
| 8 | 0,251 | 0,207 | 0,262 | 0,254 | 0,244 | 0,02477 | 10,17 |
| 9 | 0,230 | 0,205 | 0,238 | 0,214 | 0,222 | 0,01497 | 6,75 |
| 10 | 0,217 | 0,234 | 0,229 | 0,212 | 0,223 | 0,01023 | 4,59 |
| 11 | 0,128 | 0,155 | 0,136 | 0,134 | 0,138 | 0,01167 | 8,44 |
| 12 | 0,189 | 0,195 | 0,186 | 0,180 | 0,188 | 0,00624 | 3,33 |
| 13 | 0,135 | 0,133 | 0,146 | 0,153 | 0,142 | 0,00943 | 6,65 |
| ANÁLISE DE VARIÂNCIA: CV = 7,54 % | | | | | | | |

Legenda : $\bar{X}$ - Média de Absorvância s - Desvio Padrão CV% - Coeficiente de Variação

A mesma análise de variância permite concluir que a variabilidade das duplicatas de uma amostra de leite é 20 vezes menor que a variabilidade entre leites e 7 vezes menor em caso de quadruplicatas.

A adaptação proposta para leite, baseada nos trabalhos de YAO et alii (1989), com uma variação de 8%, enquadra-se como um método que apresenta boa repetibilidade e que análises efetuadas em duplicatas são satisfatórias e confiáveis.

### 1.4.2. *Efeito da adição de soro*

A fim de conhecer-se o comportamento do método em casos de leites adulterados com soro, organizou-se um experimento com esse objetivo. O teste foi realizado em 10 amostras de leites autênticos diferentes e em várias amostras de soros industriais, descongeladas no momento do uso. Simulou-se no laboratório, fraudes de cada amostra de leite com 5, 10 e 20% de soro de queijo, volumetricamente. Tomou-se duplicatas do mesmo filtrado TCA, para cada mistura de leite e soro. As médias obtidas, configuradas em blocos casualizados, foram analisadas e estão expostas na Tabela 15.

**Tabela 15. Resposta do método da ninidrina ácida para amostras de leite adicionadas de 5, 10 e 20% de soro. Resultados em Absorvância.**

| AMOSTRA | LEITE + %SORO | | | | SORO |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 5% | 10% | 20% | |
| 1 | 0,201 | 0,270 | 0,407 | 0,555 | 2,184 |
| 2 | 0,192 | 0,256 | 0,315 | 0,477 | 2,184 |
| 3 | 0,193 | 0,299 | 0,380 | 0,601 | 2,381 |
| 4 | 0,135 | 0,237 | 0,303 | 0,599 | 2,381 |
| 5 | 0,193 | 0,337 | 0,467 | 0,543 | 2,117 |
| 6 | 0,102 | 0,243 | 0,332 | 0,469 | 2,117 |
| 7 | 0,129 | 0,260 | 0,305 | 0,524 | 1,918 |
| 8 | 0,168 | 0,238 | 0,261 | 0,422 | 1,918 |
| 9 | 0,239 | 0,362 | 0,417 | 0,529 | 2,022 |
| 10 | 0,398 | 0,476 | 0,570 | 0,662 | 2,022 |
| $\bar{X}$ | $0,195^{D}$ | $0,298^{C}$ | $0,376^{B}$ | $0,538^{A}$ | 2,124 |
| s | 0,082 | 0,076 | 0,093 | 0,071 | 0,165 |
| CV % | 42,1 | 25,4 | 24,7 | 13,2 | 7,8 |

F = 140,46 ** (P < 0,01)

** Existe diferença altamente significativa entre os tratamentos ao nivel de 1% de probabilidade.

A, B, C, D : Médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nivel de 5% de probabilidade.

Pode-se concluir, então, que para os tratamentos apresentados (adição de 0, 5, 10 e 20% de soro) o método da ninidrina ácida respondeu positivamente acusando diferença significativa entre eles. Ajustando uma análise de variância da regressão nas médias obtidas para melhor observar o efeito da adição de soro no leite, obtém-se a seguinte equação de primeiro grau: $y = 0,20364 + 0,0169\ x$, para um $F = 420,11$ ($P< 0,01$) e $r = 0,9985$. Numa predição linear, as médias, para 0, 5, 10 e 20% de adição de soro são, respectivamente: 0,204 , 0,288 , 0,373 e 0,542. A comparação das médias obtidas com os dados da predição pode ser visualizada na Figura 11.

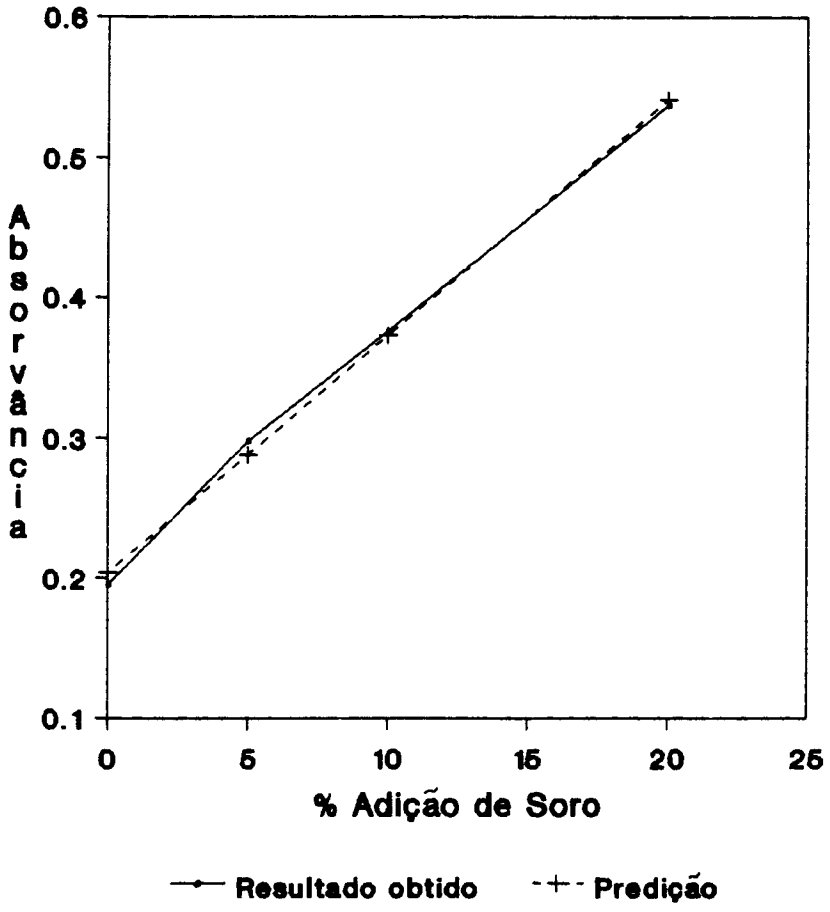



Figura 11. Efeito da adição de 5, 10 e 20% de soro de queijo em amostras de leite.

Conhecendo-se a média de absorvância do leite (0,195) e do soro (2,124) e também a porcentagem com que eles contribuiram na composição das amostras fraudadas, pode-se, matematicamente, conseguir um valor que seria o esperado para cada adição de soro. Comparando-se esse valor esperado com o que foi obtido no experimento construiu-se a Figura 12, onde se visualiza, claramente, a pequena diferença entre os dados citados, salientando-se que essa variação foi bem menor para as adições menores de soro, como 5 e 10%.

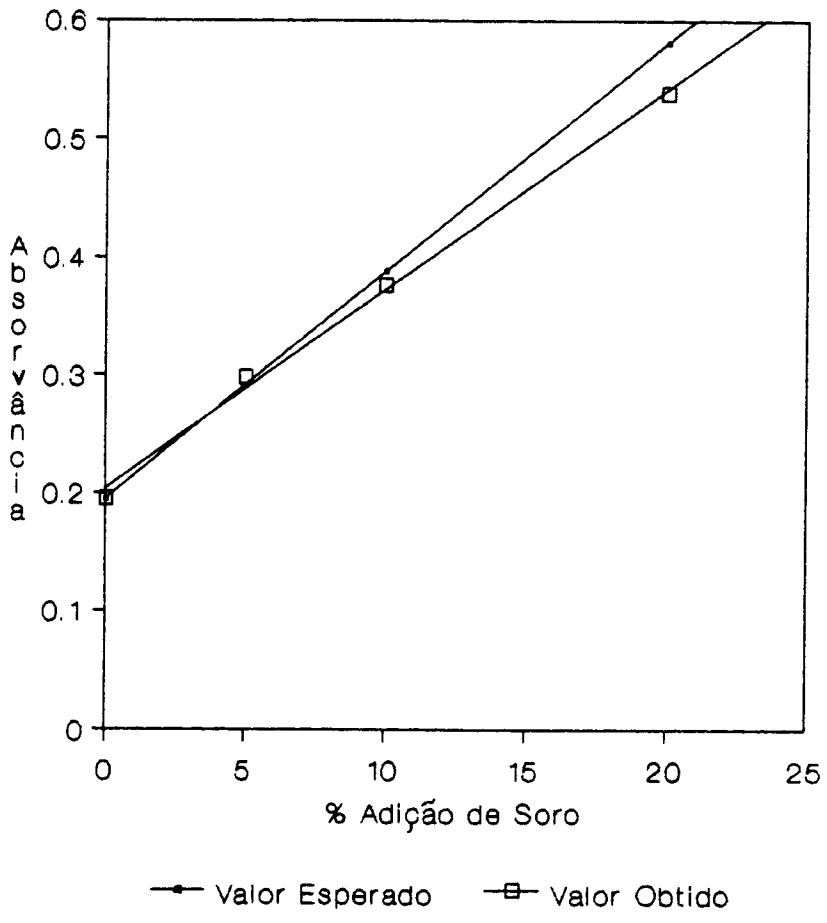



**Figura 12. Comparação entre resultados esperados e obtidos para a adição de soro à amostras de leites autênticos. Média de 10 experimentos.**

A análise desses resultados permite verificar que a variação entre os valores esperados e os obtidos para a adição de 5% de soro ao leite foi de 2,3%, para a adição de 10% foi de 3,2% enquanto que para 20% foi de 7,9%. Portanto, a resposta do método à adicão de 5, 10 e 20% de soro em 10 amostras de leite autêntico apresentou-se com uma variação abaixo de 8,0%.

Assim, de ambos os modos, verifica-se claramente que a variabilidade observada entre o esperado e o obtido foi sempre menor que a variabilidade inerente ao próprio método.

### *1.4.3. Sensibilidade da Prova*

Trabalhou-se com 5 amostras de leites autênticos diferentes e amostras de soro de queijos descongeladas no momento do uso. Para saber-se qual o nível de adição de soro que o método seria capaz de detectar, preparou-se misturas de leite e pequenas quantidades de soro, ou seja, 1, 2, 3, 4 e 5% de soro. Para cada mistura foram tomadas quadruplicatas do filtrado TCA. As médias das quadruplicatas compõem a Tabela 16.

Pelos dados expostos, observa-se que há diferença entre os tratamentos mas que ela só é significativa, em relação ao leite que deu origem à mistura, à partir de 2% de adição de soro. Numa análise de variância da regressão das médias obtidas,

Tabela 16. Teste de Sensibilidade do método da ninidrina ácida para pequenas quantidades de soro adicionado ao leite. Resultados em Absorvância.

| AMOSTRA | LEITE | ADIÇÃO DE SORO AO LEITE | | | | | SORO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1% | 2% | 3% | 4% | 5% | |
| 1 | 0,159 | 0,156 | 0,174 | 0,208 | 0,212 | 0,242 | 1,970 |
| 2 | 0,085 | 0,093 | 0,117 | 0,126 | 0,134 | 0,139 | 1,688 |
| 3 | 0,084 | 0,107 | 0,123 | 0,148 | 0,148 | 0,169 | 1,688 |
| 4 | 0,076 | 0,109 | 0,118 | 0,127 | 0,193 | 0,177 | 1,697 |
| 5 | 0,143 | 0,128 | 0,168 | 0,205 | 0,225 | 0,227 | 1,697 |
| $\bar{X}$ | $0,109^{E}$ | $0,119^{DE}$ | $0,140^{CD}$ | $0,163^{BC}$ | $0,182^{AB}$ | $0,191^{A}$ | 1,748 |
| s | 0,038 | 0,024 | 0,028 | 0,041 | 0,04 | 0,043 | 0,124 |
| CV % | 35,4 | 20,4 | 11,9 | 25,1 | 21,9 | 22,3 | 7,1 |
| F = 29,71 ** | | (P < 0,01) | | | | | |

** Existe diferença altamente significativa entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade.
A,B,C,D,E: Médias seguidas de pelo menos 1 letra igual não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

temos uma equação de primeiro grau (y = 0,1063 + 0,0177 x), com um r igual a 0,9913. As médias, para a adição de 0, 1, 2, 3, 4 e 5% de soro, segundo a predição linear são: 0,106, 0,124, 0,142, 0,159, 0,177 e 0,195. A comparação entre esses dados e as médias obtidas no experimento é visualizada na Figura 13.

A sensibilidade do método à adição de pequenas porcentagens de soro leva a um aspecto prático que é a sua capacidade de detectar fraudes sutis em leite fluido.

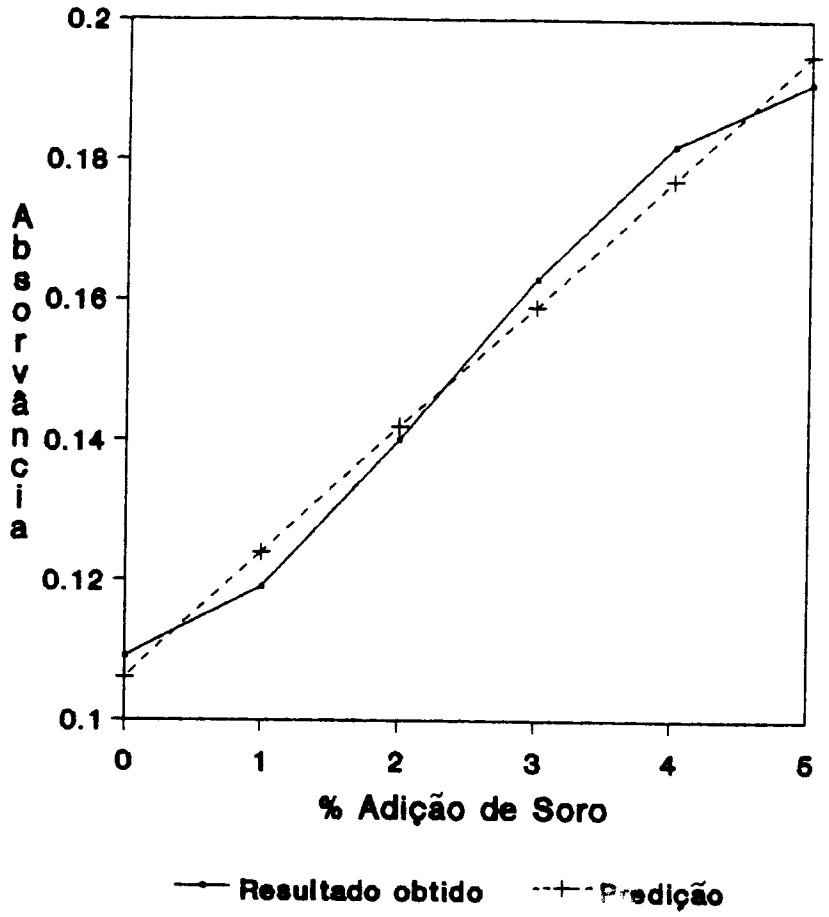



Figura 13. Teste de Sensibilidade do método da ninidrina ácida frente à adição de pequenas quantidades de soro de queijo.

## 2. ESTUDO DE ALGUMAS VARIÁVEIS

### *2.1. DIFERENCIAÇÃO ENTRE LEITES COLETADOS NA FAZENDA E NA PLATAFORMA INDUSTRIAL*

Nesta fase, procurou-se avaliar se o tempo decorrido entre a ordenha e a entrega do leite ao laticínio, como

também, se o próprio percurso (traduzido por um transporte em latões que, além da agitação constante, recebe a incidência de raios solares e outras ocorrências rotineiras nesse tipo de atividade) alteraria o teor de NANA do leite. Assim comparou-se amostras de leite coletadas logo após a ordenha com amostras do mesmo leite quando da sua chegada à plataforma de recepção na indústria.

Os resultados desse delineamento de blocos casualizados encontram-se expostos e analisados na Tabela 17.

**Tabela 17. Pesquisa de ácido siálico em amostras de leite coletadas na fazenda e na plataforma industrial.**

| | Local de Coleta | | | Local de Coleta | |
|---|---|---|---|---|---|
| AMOSTRA | FAZENDA | PLATAFORMA | AMOSTRA | FAZENDA | PLATAFORMA |
| 1 | 0,135 | 0,141 | 16 | 0,103 | 0,108 |
| 2 | 0,118 | 0,126 | 17 | 0,256 | 0,244 |
| 3 | 0,170 | 0,568 | 18 | 0,115 | 0,139 |
| 4 | 0,142 | 0,178 | 19 | 0,108 | 0,114 |
| 5 | 0,097 | 0,131 | 20 | 0,084 | 0,095 |
| 6 | 0,094 | 0,128 | 21 | 0,100 | 0,088 |
| 7 | 0,090 | 0,103 | 22 | 0,107 | 0,143 |
| 8 | 0,080 | 0,064 | 23 | 0,104 | 0,106 |
| 9 | 0,099 | 0,151 | 24 | 0,167 | 0,200 |
| 10 | 0,075 | 0,101 | 25 | 0,155 | 0,180 |
| 11 | 0,123 | 0,190 | 26 | 0,140 | 0,398 |
| 12 | 0,113 | 0,126 | 27 | 0,095 | 0,131 |
| 13 | 0,098 | 0,123 | 28 | 0,103 | 0,182 |
| 14 | 0,128 | 0,234 | 29 | 0,097 | 0,140 |
| 15 | 0,088 | 0,115 | | | |
| | | | $\overline{X}$ | $0,117^{A}$ | $0,184^{B}$ |
| | | | F = 9,01 ** | (P < 0,01) | |

** Existe diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade.
A, B: Médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade.

A média de absorvância para as 29 amostras submetidas ao tratamento 1 foi de 0,117, enquanto que, para o tratamento 2 foi de 0,164. Pelo teste de Tukey pode-se verificar que há interferência dos tratamentos , isto é, tudo que o leite sofre durante o trajeto da fazenda ao laticínio ( agitação, aumento de temperatura, desenvolvimento microbiano, etc...) devem provocar uma certa hidrólise protéica com liberação provável do GMP, responsável pelo aumento do teor de NANA nas amostras. Assim, nesse caso, em termos médios observou-se um aumento aproximado de 40,2% na absorvância, valor bastante elevado e responsável pela significância da diferença demonstrada.

## *2.2. INTERFERÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO SOBRE O TEOR DE ÁCIDO SIÁLICO*

Na literatura, vários autores citam a temperatura como fator de modificação do teor de NANA. Para confirmar esses dados elaborou-se um experimento onde seria possível comparar dados de leite crú com dados desse mesmo leite pasteurizado.

Os resultados submetidos à avaliação estatística (blocos casualizados) estão expostos na Tabela 18.

As médias de absorvâncias encontradas foram para leite crú de 0,170 e para leite pasteurizado 0,159, correspondendo, em termos de concentração, à 2,75 e 2,55 μg/ml de

Tabela 18. **Pesquisa de ácido siálico comparando amostras de leite crú e pasteurizado.**

| AMOSTRA | L E I T E | |
|---|---|---|
| | CRÚ | PASTEURIZADO |
| 1 | 0,198 | 0,156 |
| 2 | 0,164 | 0,138 |
| 3 | 0,170 | 0,159 |
| 4 | 0,156 | 0,144 |
| 5 | 0,138 | 0,139 |
| 6 | 0,138 | 0,118 |
| 7 | 0,172 | 0,159 |
| 8 | 0,170 | 0,178 |
| 9 | 0,184 | 0,166 |
| 10 | 0,182 | 0,188 |
| 11 | 0,163 | 0,182 |
| 12 | 0,197 | 0,192 |
| 13 | 0,186 | 0,173 |
| 14 | 0,150 | 0,140 |
| 15 | 0,178 | 0,163 |
| 16 | 0,174 | 0,157 |
| $\bar{X}$ | $0,170^{A}$ | $0,159^{B}$ |
| F = 8,52 * (P < 0,05) | | |

*Existe diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade.
A,B: Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

amostra. O teste de Tukey revela que há diferença na taxa de ácido siálico entre leite crú e pasteurizado, observando-se, nesse caso, um decréscimo.

ARUMUGHAN et alii (1979) encontrou para leites que continham em média 3,66 ± 0,16 mg NANA/g CN integral, uma ligeira diminuição quando pasteurizados à 71°C / 15 minutos. Essa diferença à menor aumentou progressivamente com a submissão do

leite à temperaturas mais altas. KHALIFA et alii (1985b) trabalhando com temperaturas variando de 70 à 140$^{o}$C observou que a liberação de NANA aumenta concomitantemente com a severidade do tratamento.

Portanto, a ligeira diminuição do teor de NANA encontrada no experimento é similar à observada por ARUMUGHAN et alii (1979) (Tabela 05).

## 3. COMPARAÇÃO ENTRE O MÉTODO PROPOSTO E A METODOLOGIA OFICIAL

### *3.1. CURVA PADRÃO PARA O MÉTODO OFICIAL*

O método oficial é uma prova qualitativa, porém com a adição de acetona pode-se levá-lo à uma leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 565 nm.

A fim de comparar quantitativamente o método proposto com o oficial, confeccionou-se, para esse último, uma curva padrão partindo-se de uma solução de ácido siálico na concentração de 294 µg/ml. À quantidades variáveis dessa solução, além de se elevar o volume para 1,0 ml com água deionizada, adicionou-se 2,0 ml de $H_2SO_4$ 0,1 N, 0,5 ml de regente de Ehrlich e 2,0 ml de acetona, tendo um volume final de 5,5 ml.

A reta obtida por regressão linear pode ser visualizada na Figura 14. A equação da reta encontrada foi y = 0,029186 + 0,001940 x com um coeficiente de correlação de 0,9994.

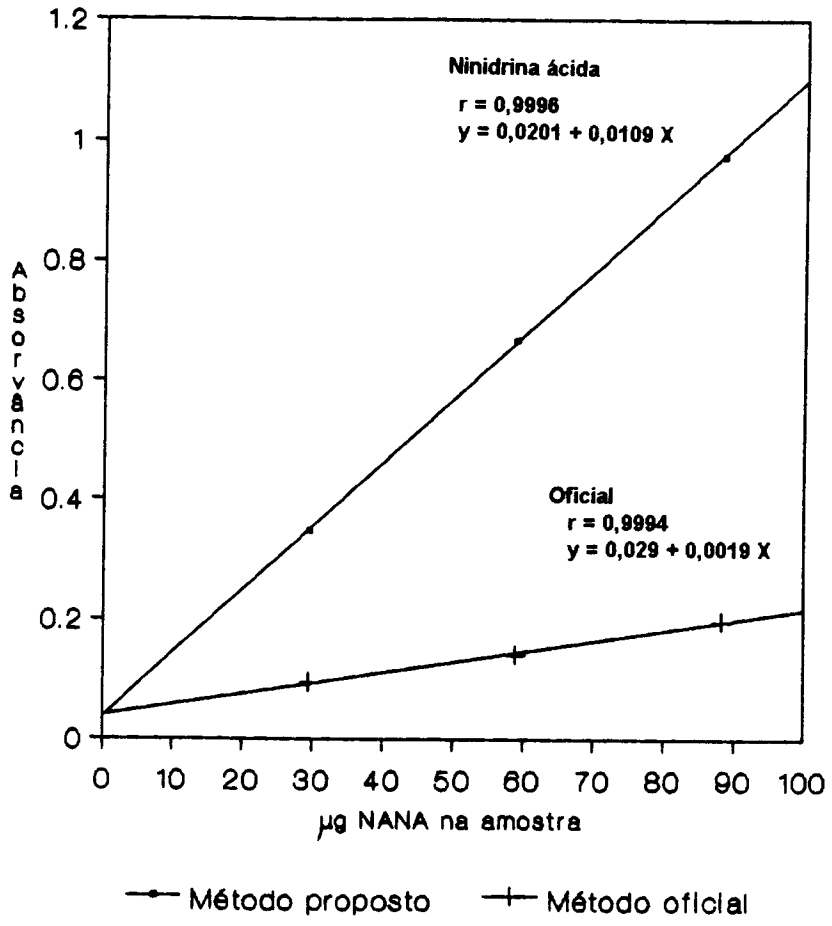



**Figura 14. Comparação entre curvas padrão segundo metodologia oficial e a da ninidrina ácida.**

É interessante notar que para as mesmas concentrações de ácido siálico, como por exemplo: 29,4 µg na amostra, através do método oficial obtém-se uma absorvância de 0,094 contra 0,329 do método proposto. Outros exemplos podem ser

facilmente comparados pelos dados apresentados. Essa diferença decorre da baixa absortividade ($a^{1mg/ml}$) do método oficial. Assim, $a^{1mg/ml}$ calculada para o método oficial foi de 11,96 enquanto que a calculada para o método proposto foi de 34,23, ou seja, para uma mesma concentração, a resposta do método proposto foi de 2,86 vezes maior, isto sem contar que, para o método oficial a quantidade de amostra necessária quando aplicada ao leite é 2,5 vezes maior. De outro modo, usando-se a absortividade molar ($E^{molar}$) calculada para os dois métodos, verifica-se a mesma correlação, ou seja, $E_{565\ nm} = 4,04 \times 10^3$ e a $E_{470\ nm} = 1,06 \times 10^4$.

## *3.2. COMPORTAMENTO DOS MÉTODOS*

### *3.2.1. Frente à adição de soro*

A 10 amostras de leites autênticos diferentes, simulou-se fraudá-las com 2, 5 e 10% de soro industrial (v/v), submetendo-se cada mistura à determinação de ácido siálico pelas técnicas proposta (partindo-se de 10 ml de filtrado TCA) e oficial (pesquisando sobre 25 ml de filtrado). Os valores obtidos em absorvâncias estão na Tabela 19.

Tabela 19. **Comparação entre médias de absorvâncias (duplicatas) para amostras de leites adicionadas de soro e submetidas à determinação de ácido siálico pelos métodos da ninidrina ácida e oficial.**

| AMOSTRA | ADIÇÃO DE SORO AO LEITE | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | LEITE | | 2% | | 5% | | 10% | | SORO | |
| | Y | O | Y | O | Y | O | Y | O | Y | O |
| 1 | 0,279 | 0,085 | 0,311 | 0,093 | 0,427 | 0,115 | 0,612 | 0,171 | 2,949 | 0,594 |
| 2 | 0,228 | 0,077 | 0,263 | 0,099 | 0,335 | 0,098 | 0,430 | 0,142 | 2,963 | 0,569 |
| 3 | 0,280 | 0,088 | 0,291 | 0,113 | 0,385 | 0,110 | 0,508 | 0,153 | 2,963 | 0,569 |
| 4 | 0,262 | 0,118 | 0,356 | 0,124 | 0,452 | 0,163 | 0,545 | 0,179 | 2,937 | 0,740 |
| 5 | 0,192 | 0,078 | 0,227 | 0,093 | 0,281 | 0,111 | 0,369 | 0,150 | 2,403 | 0,635 |
| 6 | 0,198 | 0,086 | 0,243 | 0,098 | 0,281 | 0,115 | 0,381 | 0,148 | 2,403 | 0,635 |
| 7 | 0,208 | 0,079 | 0,219 | 0,089 | 0,277 | 0,119 | 0,421 | 0,139 | 2,403 | 0,635 |
| 8 | 0,304 | 0,101 | 0,374 | 0,125 | 0,607 | 0,190 | 0,831 | 0,241 | 3,416 | 0,678 |
| 9 | 0,186 | 0,064 | 0,216 | 0,088 | 0,277 | 0,123 | 0,422 | 0,183 | 3,416 | 0,678 |
| 10 | 0,167 | 0,054 | 0,237 | 0,087 | 0,369 | 0,127 | 0,505 | 0,187 | 3,416 | 0,678 |
| Média | 0,230 | 0,083 | 0,274 | 0,101 | 0,369 | 0,127 | 0,502 | 0,169 | 2,927 | 0,641 |
| s | 0,047 | 0,018 | 0,057 | 0,014 | 0,106 | 0,028 | 0,138 | 0,031 | 0,414 | 0,054 |
| CV % | 20,63 | 21,50 | 20,87 | 14,38 | 28,67 | 21,99 | 27,59 | 18,18 | 14,15 | 8,48 |

Legenda: Y = Método proposto (adaptação do Método de YAO et alii, 1989)
O = Método Oficial (Ministério da Agricultura)

Estes mesmos valores podem ser visualizados na Figura 15.

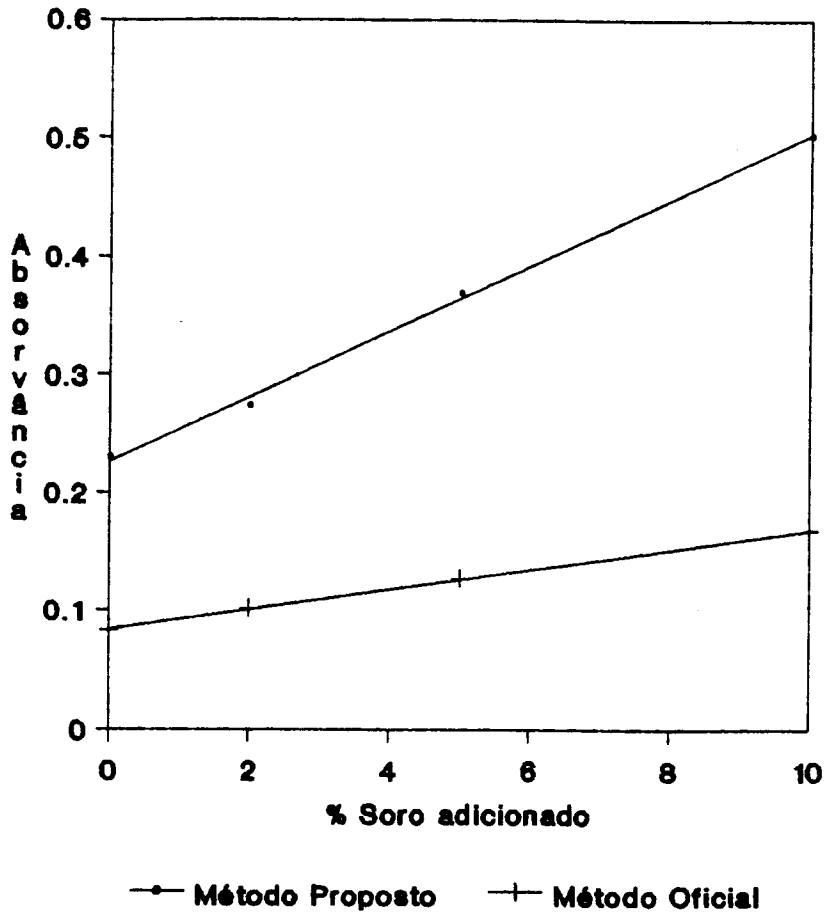



Figura 15. Comparação entre técnicas da ninidrina ácida e oficial. Resposta à adição de soro ao leite.

Pelo método proposto, pode-se observar que a resposta espectrofotométrica é bem maior que a do método oficial para amostras de leite idênticas, mesmo partindo-se de quantidades diferentes de filtrado. Nota-se, também, que a inclinação da reta é maior para o método proposto, sugerindo uma melhor resposta ao aumento do teor de soro adicionado. Esses aspectos confirmam os resultados anteriormente discutidos em termos de resposta espectrofotométrica no Item 3.1..

### *3.2.2. Comparação ponto à ponto*

Com os dados da Tabela 19, construiu-se a Figura 16, de maneira que as duas metodologias fossem comparadas ponto a ponto, desde o leite autêntico, até a adição de 10 % de soro para todas as amostras. Desse modo, garantiu-se que ambos os métodos estariam estimando a mesma variável em condições diferenciadas.

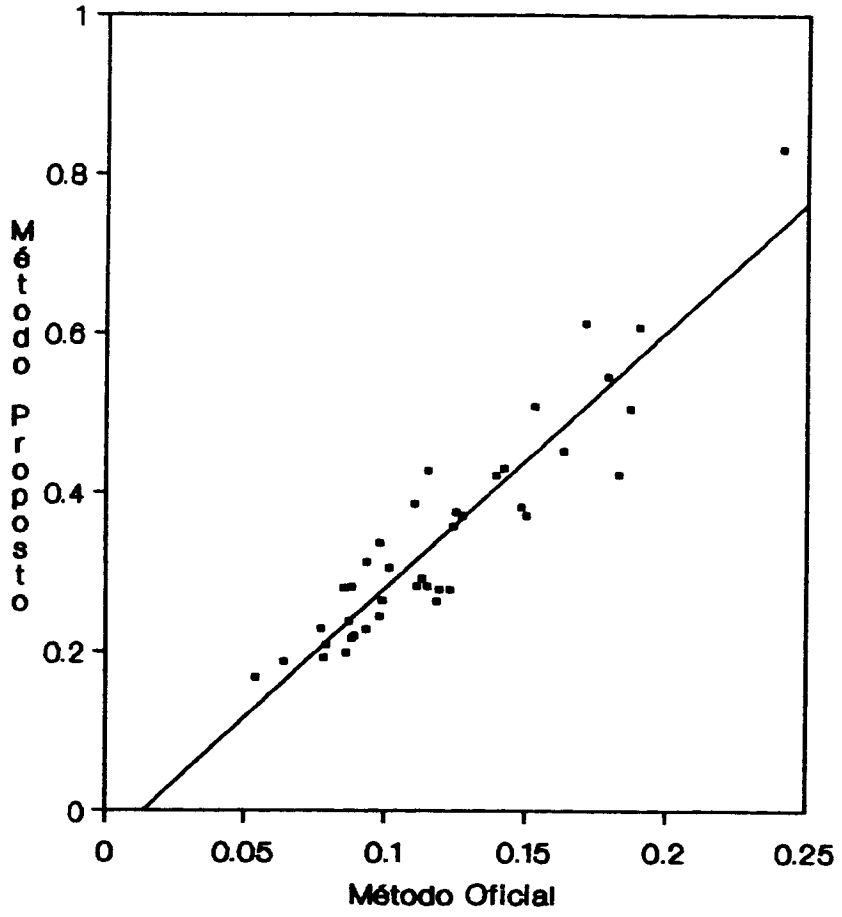



Figura 16. Comparação ponto a ponto entre as absorvâncias obtidas para as mesmas amostras de leite pelos métodos da ninidrina ácida e oficial.

A equação da reta foi y = - 0,046773 + 3,24962 X, para um r = 0,9282. Elevando-se o valor de r ao quadrado, confirma-se que 86% da variabilidade é explicada pela regressão.

### *3.2.3. Comparação geral dos métodos*

Feita a caracterização individual do comportamento dos métodos, para cada uma das situações analisadas, e partindo-se da premissa que ambos os métodos quantificam a mesma substância (NANA) em circunstâncias e procedimentos diferenciados, procurou-se, através de análise estatística quantificar as possíveis igualdades ou diferenças.

Assim, os mesmos dados da Tabela 19 foram submetidos a análise fatorial 2 x 4, sendo $A_1$ e $A_2$ os métodos, respectivamente, proposto e oficial e $B_1$, $B_2$, $B_3$ e $B_4$, respectivamente, leite autêntico e adicionado de 2%, 5% e 10% de soro de queijo, com dez repetições dentro de cada Fator B, considerando-se que essas repetições referem-se a diferentes amostras de leite.

Combinando-se esses fatores ponto a ponto numa análise de variância, pode-se afirmar com 99% de segurança que:

1º) Existe diferença entre os métodos (F= 210,0764) na quantificação da resposta à substância analisada.

2º) Existe diferença entre as adições de soro (F= 26,1556), independentemente do método e, pelo teste de Tukey, a variação torna-se significativa somente a partir da adição de 5% de soro.

3º) Com um F= 7,2390, a análise demonstra que há interação entre método e fraude e esta depende do método empregado

No estudo das interações entre os fatores A e B pode-se:

a) Afirmar com 99% de segurança que há diferença significativa entre as distintas adições de soro dentro do método proposto, porém, esta confiabilidade reduz-se para 95% em relação ao método oficial.

b) Afirmar com 99% de segurança que há uma diferença significativa e valor de F crescente quando se analisa a interferência das adições de soro independentemente do método analisado.

Estimando-se estatisticamente os desdobramentos dos fatores A e B, pode-se ter várias comparações:

1º) TESTE DE TUCKEY PARA MÉDIAS DE B DENTRO DE $A_1$:

O método proposto não apresenta diferença entre as médias para o leite autêntico e a adição de 2% de soro, porém diferencia-se dessas e entre si as médias para a adição de 5 e

10% de soro.

2º) TESTE DE TUCKEY PARA AS MÉDIAS DE B DENTRO DE $A_2$

O método oficial não detecta diferenças significativas entre o leite autêntico e as adições de 2% e 5% de soro. Concluindo, pode-se afirmar que só há diferença significativa entre o leite autêntico e 10% de adição de soro.

3º) TESTE DE TUCKEY PARA AS MÉDIAS DE A DENTRO DE B:

Comprovando análises de situações anteriores, verificou-se, nesse caso, que as médias obtidas pelos distintos métodos para todas as adições de soro diferiram significativamente.

Essas mesmas conclusões foram confirmadas pelo delineamento em blocos casualizados onde o possível efeito dos blocos (repetições) é minimizado. Assim, a Figura 15 sintetiza as regressões obtidas para cada método.

## 4. DISTRIBUIÇÃO AMOSTRAL

Definidos os parâmetros de adaptação do método, visando sua aplicação prática à rotina de determinação de possíveis fraudes por adição de soro a leites fluidos, tornou-se necessário conhecer-se os universos amostrais básicos, quais sejam, para leites considerados normais ou autênticos e para soro

industrial, uma vez que esse é o elemento utilizado para a prática da fraude.

A literatura demonstra que apenas parte da k-caseína é glicosilada. Demonstra, também, que essa glicosilação é altamente variável, genotípica e fenotípicamente, principalmente em função da raça, estágio de lactação, números de partos, etc... Pela padronização do método, busca-se o GMP livre, que, como é de se esperar, também está sujeito à mesma variabilidade, ou a uma variabilidade parecida, uma vez que os fatores de liberação do GMP não são necessariamente os mesmos.

Existem duas maneiras básicas de obter-se o universo amostral autêntico: primeiro, buscando-se na origem, amostras de leite recém-ordenhado de animais normais e clinicamente saudáveis e, segundo, obtendo-se essas mesmas amostras na plataforma de recepção de indústrias de laticínios, embora nessa última, incorpora-se os fatores de tempo pós-ordenha e condições de transporte (já comentados no ítem 2.1.), apesar de, na totalidade, ambos constituírem-se em amostras de conjunto de animais.

Na prática, dentro dos objetivos de definição e padronização do método, sua aplicabilidade justifica-se, principalmente, para as análises de leite recebido nas plataformas das indústrias de laticínios, almejando-se que o teste constitua-se num "*screening*" de autenticidade do leite recebido quanto às possíveis fraudes por adição de soro.

Como essas amostras são diferentes e face à literatura mostrando que vários fatores interferem na liberação do GMP, optou-se, inicialmente, por obter-se distribuições amostrais independentes ou separadas, facilitando a sua comparação.

### *4.1. LEITE CRÚ AUTÊNTICO*

As amostras coletadas no ponto de origem, isto é, na própria fazenda produtora, durante a ordenha da manhã, são seguramente isentas de qualquer substância que ponham em dúvida a sua autenticidade. Essas amostras foram acondicionadas e transportadas até o laboratório, de maneira que a elas não fossem somados todos aqueles interferentes já citados, comuns ao transporte de latões por caminhões de linhas de leite. Ao todo, foi possível constituir uma distribuição com 114 amostras.

Como pode ser observado no Histograma de Frequência (Figura 17), os resultados foram ajustados à uma curva de distribuição normal, cuja média de absorvância foi de 0,168, com um desvio-padrão (s) de 0,0655 e coeficiente de variação (CV) de 38,9%, com o objetivo de definir os pontos de corte.

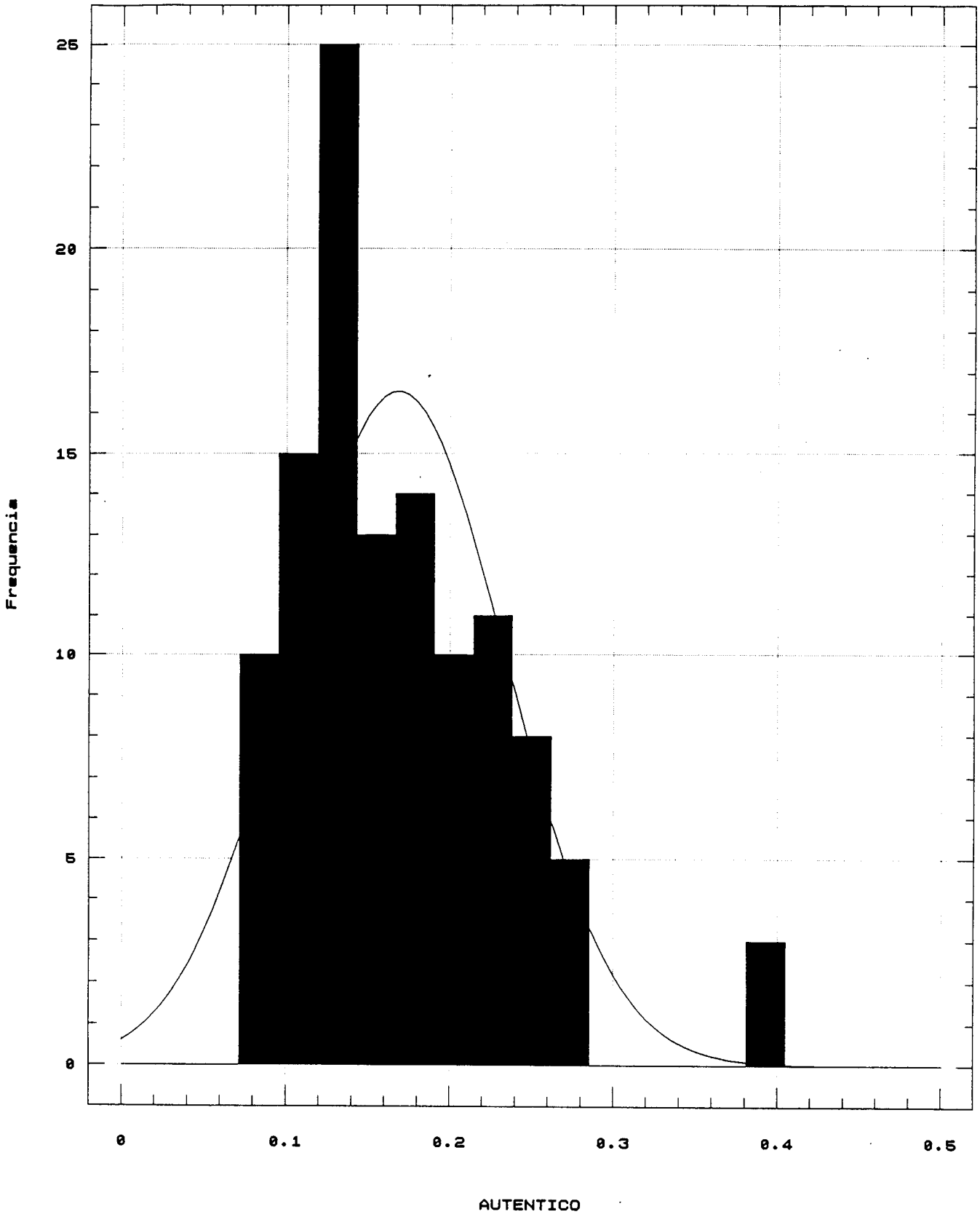



Figura 17. Histograma de Frequência para resultados em absorvância de 114 amostras de leite crú autêntico.

Aplicando-se o método "*Box and Whisker Plot*" do programa "*Statgraph*" (Figura 18), temos que 25% dos valores situaram-se abaixo da absorvância 0,124, 50% até 0,155, 75% até 0,210 e 95% até 0,283.

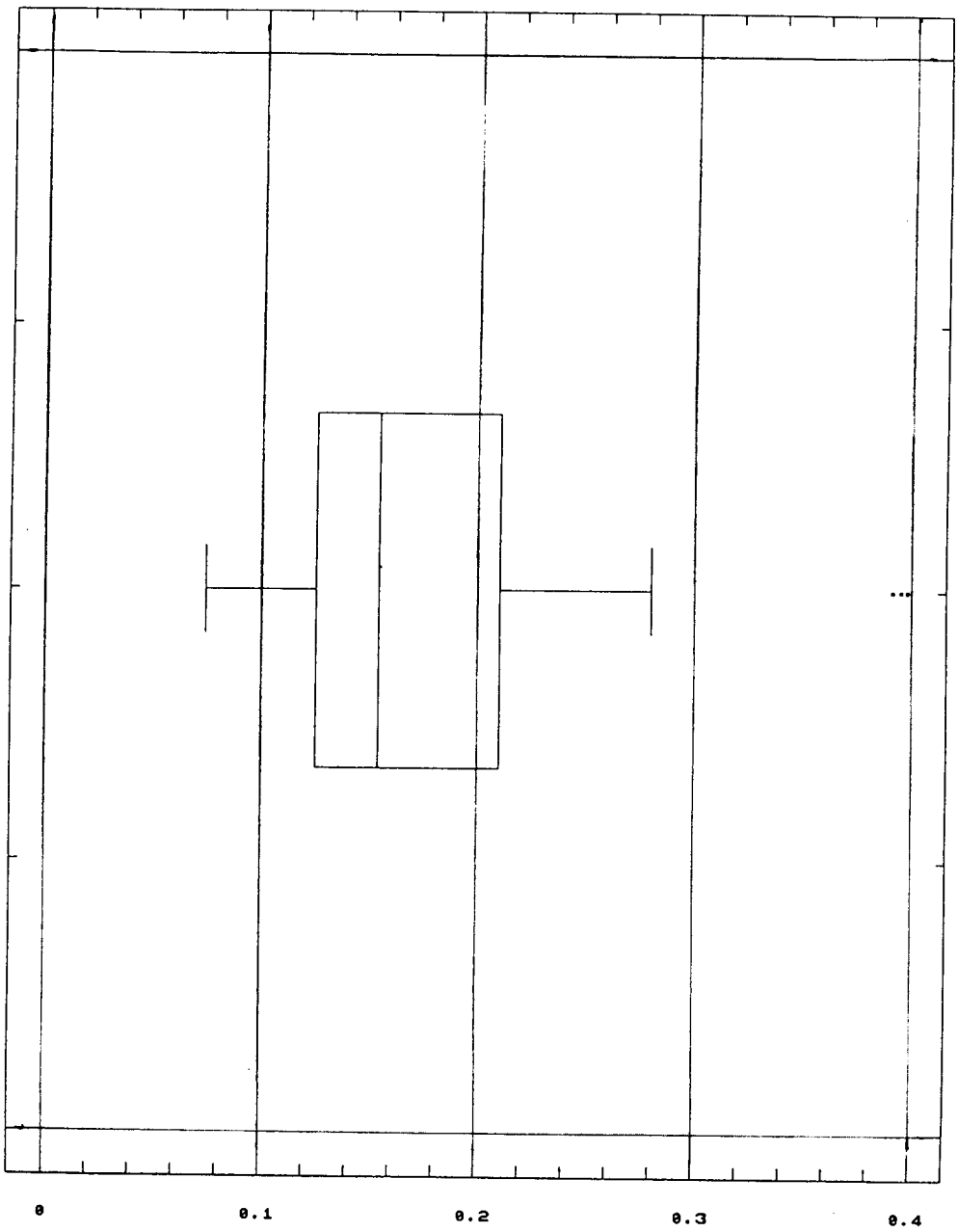



Figura 18. **Representação dos resultados de 114 amostras de leite crú autêntico. (Método "Box and Whisker Plot" ).**

## *4.2. LEITE CRÙ DE PLATAFORMA*

Nesse grupo estão incluidas todas as amostras coletadas na plataforma durante a recepção do leite, formando um conjunto representado por leite transportado em latões, oriundo de produtores de uma mesma região, bem como de leite transportado em caminhões-tanques reunindo produtores de outras regiões, resultando, portanto, na mistura de um número bem maior de produtores.

Esse grupo foi constituído por 213 amostras de leite, com absorvância média de 0,263, s = 0,157 e CV de 59,7%, ajustado também à uma curva de distribuição normal, conforme Histograma de Frequência (Figura 19).

Utilizando-se o mesmo método computacional, a distribuição dos resultados (Figura 20) ficou assim estabelecida: até a absorvância 0,162 engloba-se 25% dos resultados , até 0,217 atinge-se 50% , até 0.300 estão 75%, sendo que até 0,437 estão 95% deles.

Isso confirma o que foi discutido no ítem 2.1.

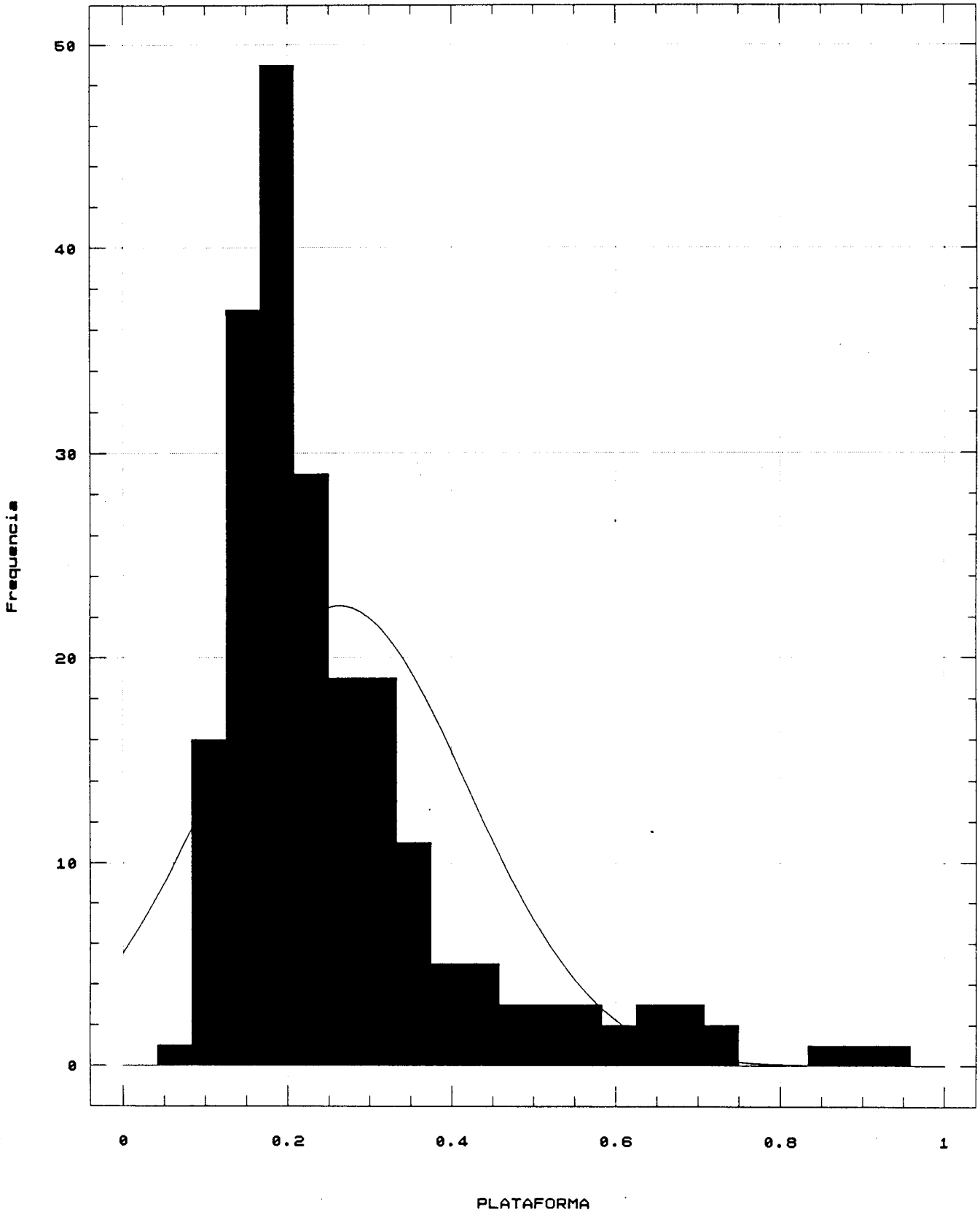



Figura 19. Histograma de Frequência para resultados em absorvância de 213 amostras de leite crú de plataforma.

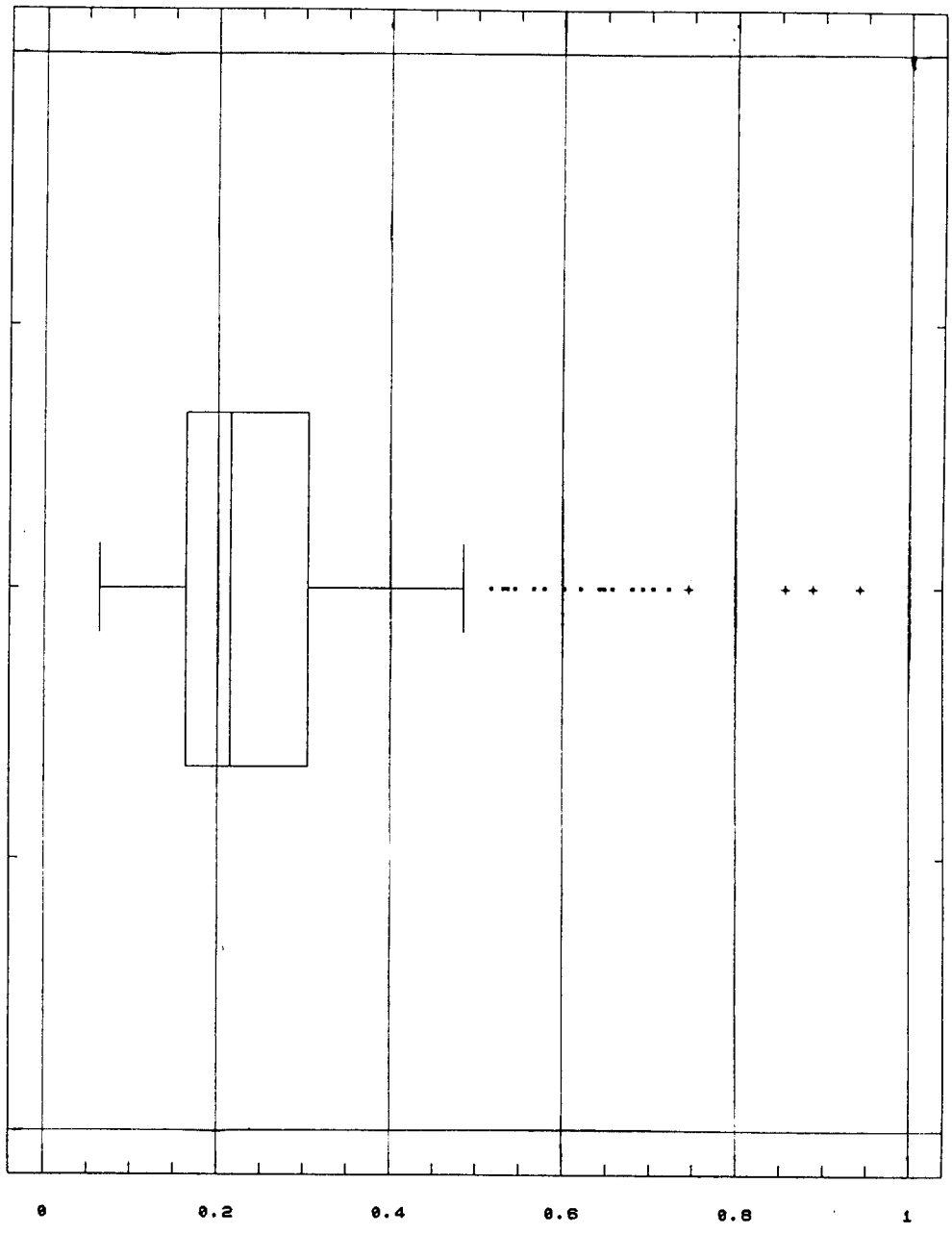



Figura 20. Representação dos resultados de 213 amostras de leite crú de plataforma. (Método "Box and Whisker Plot" ).

## *4.3. SORO*

Em 56 amostras de soro industrial analisadas, o teor médio de NANA foi de 42,35 µg/ml de soro. Estatisticamente, o intervalo determinado com dois desvios-padrão sobre a média observada projetou o intervalo de 28,4 à 56,3 µg/ml de soro industrial, entretanto o menor valor observado foi 36,5 µg/ml e o máximo 70,5 µg/ml, embora esse último constituiu uma ocorrência isolada,isto é, um valor único que não mais se repetiu. Os resultados dessas amostras estão agrupados na Tabela 20.

O teor de NANA livre observado para o leite crú autêntico foi de 2,71 µg/ml. No soro, o teor de NANA livre apresenta, em média, 15,63 (13,5-26,0) vezes maior que no leite. Por outro lado, isso demonstra que, sempre em termos médios para as amostras analisadas, cerca de 6,49% do total de NANA liberado pela renina (quimosina) durante a coagulação enzimática do leite para a fabricação de queijos, encontra-se livre no leite, antes da utilização da enzima. Considerando-se os valores obtidos para o leite de plataforma tem-se que 10,5% do NANA é liberado sem ação da renina.

Tabela 20. Absorvâncias de 56 amostras de soro de queijo submetidas à pesquisa para ácido siálico segundo método da ninidrina ácida.

| AMOSTRA | ABSORVÂNCIA | AMOSTRA | ABSORVÂNCIA | AMOSTRA | ABSORVÂNCIA |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,775 | 20 | 2,038 | 39 | 3,864 |
| 2 | 2,237 | 21 | 2,180 | 40 | 2,184 |
| 3 | 2,012 | 22 | 2,134 | 41 | 2,280 |
| 4 | 2,607 | 23 | 2,204 | 42 | 2,117 |
| 5 | 2,405 | 24 | 2,302 | 43 | 2,022 |
| 6 | 2,015 | 25 | 2,056 | 44 | 2,378 |
| 7 | 2,506 | 26 | 2,164 | 45 | 2,117 |
| 8 | 2,450 | 27 | 2,044 | 46 | 2,184 |
| 9 | 2,490 | 28 | 2,032 | 47 | 2,124 |
| 10 | 2,812 | 29 | 2,120 | 48 | 2,149 |
| 11 | 2,864 | 30 | 2,090 | 49 | 2,626 |
| 12 | 2,042 | 31 | 2,100 | 50 | 2,326 |
| 13 | 2,119 | 32 | 2,140 | 51 | 2,250 |
| 14 | 2,088 | 33 | 2,146 | 52 | 2,949 |
| 15 | 2,126 | 34 | 2,070 | 53 | 2,963 |
| 16 | 2,096 | 35 | 2,172 | 54 | 3,416 |
| 17 | 2,170 | 36 | 2,048 | 55 | 2,937 |
| 18 | 2,118 | 37 | 2,018 | 56 | 2,403 |
| 19 | 2,132 | 38 | 2,934 | | |

Média de Absorvância = 2,328 (42,35 µg NANA/ml)
Desvio Padrão = 0,380
Coeficiente de Variação = 16,24 %

### *4.4. PROPOSIÇÃO DE APLICABILIDADE DO MÉTODO COMO TESTE DE " SCREENING " EM PLATAFORMA*

Para esse propósito resolveu-se englobar todos os dados obtidos nos diversos experimentos, tendo como justificativa que vários leites chegam à plataforma logo após a ordenha, levados pelos próprios produtores, portanto em melhores condições de transporte, em tempo e percurso menores e na maioria da vezes protegidos da incidência solar.

O Histograma de Frequência (Figura 21) foi

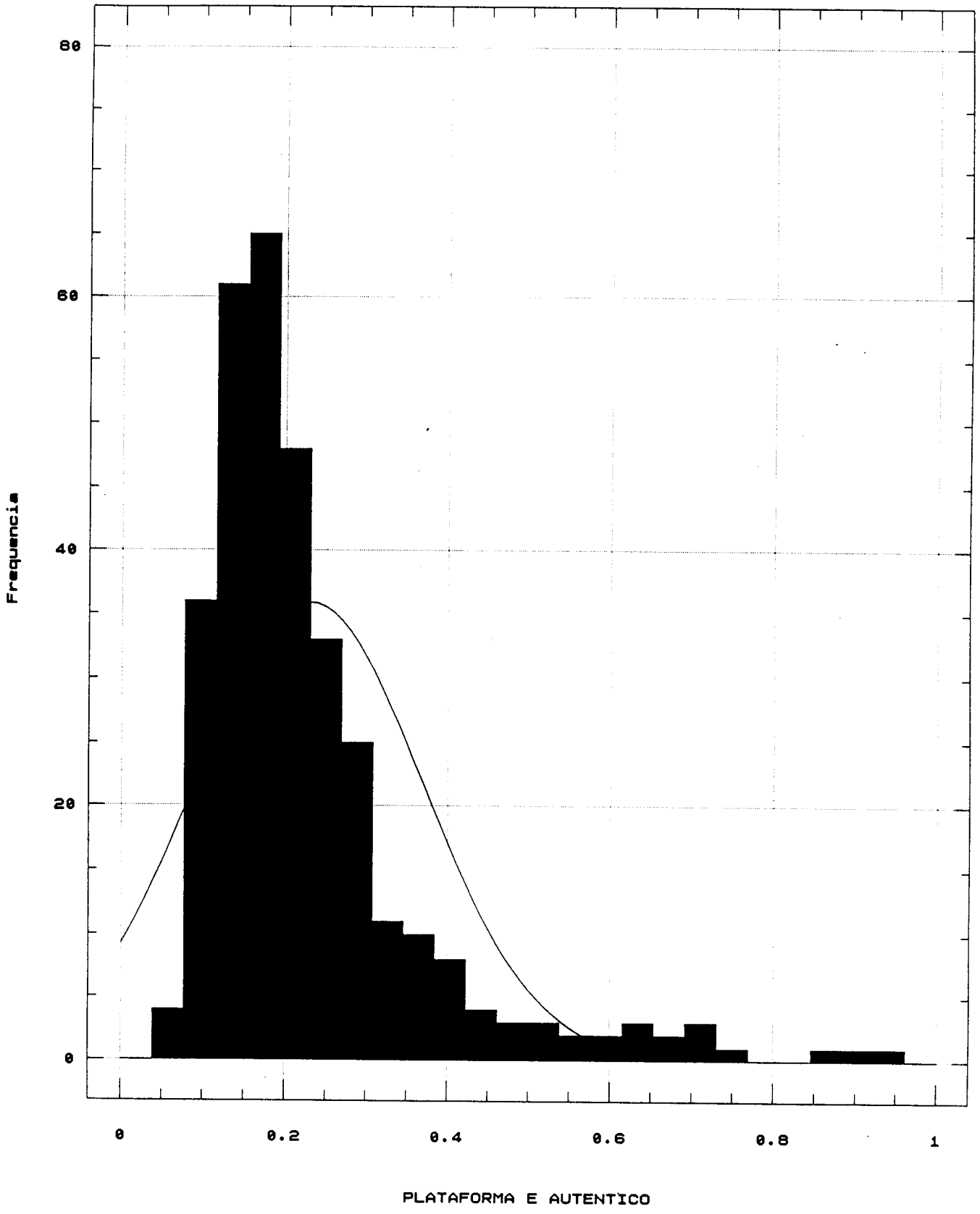



Figura 21. Histograma de Frequência para resultados em absorvância de 327 amostras de leite crú.

elaborado com 327 dados em absorvância. A média obtida foi 0,230, com s = 0,1398 e CV = 60,8%, ajustando-o à uma distribuição normal. Os limites máximos de absorvância para as faixas onde se encontram 25, 50, 75 e 95% dos resultados são: 0,142, 0,192, 0,267 e 0,450 respectivamente (Figura 22).

Assim, quantitativamente, esses valores de absorvância correspondem a: 2,23 µg de NANA/ml de leite para até 25% das amostras; 3,15 µg/ml para 50% das amostras; 4,53 µg/ml para até 75% das amostras e, finalmente, 7,89 µg/ml para até 95% das amostras. No soro, o teor de NANA livre apresenta-se 11 (9,5-18,3) vezes maior que no leite, considerando-se a média de 3,85 µg/ml. Desse modo, ao nível de plataforma e para a região estudada, verifica-se, com 95% de segurança, que, valores acima de 7,89 µg de NANA/ml constituiram-se em ocorrências raras, cuja frequência foi inferior a 2,3% do total dos resultados, de vez que a distribuição normal tende a infinito em direções opostas. Na prática, para amostras coletadas em plataformas de recepção de laticínios, espera-se então que, no máximo 2,3% dos resultados possam situar-se ligeiramente acima dessa concentração de 7,89 µg de NANA/ml de leite.

Por outro lado, recorrendo-se a outras medidas de tendência central que não simplesmente a média aritmética, onde o efeito de possíveis valores anormalmente baixos ou elevados é matematicamente minimizado, verifica-se que a mediana situou-se em A = 0,192 (3,15 µg NANA/ml de leite); a média geométrica em A = 0,201 (3,32 µg NANA/ml de leite); e a moda, isto é, o valor

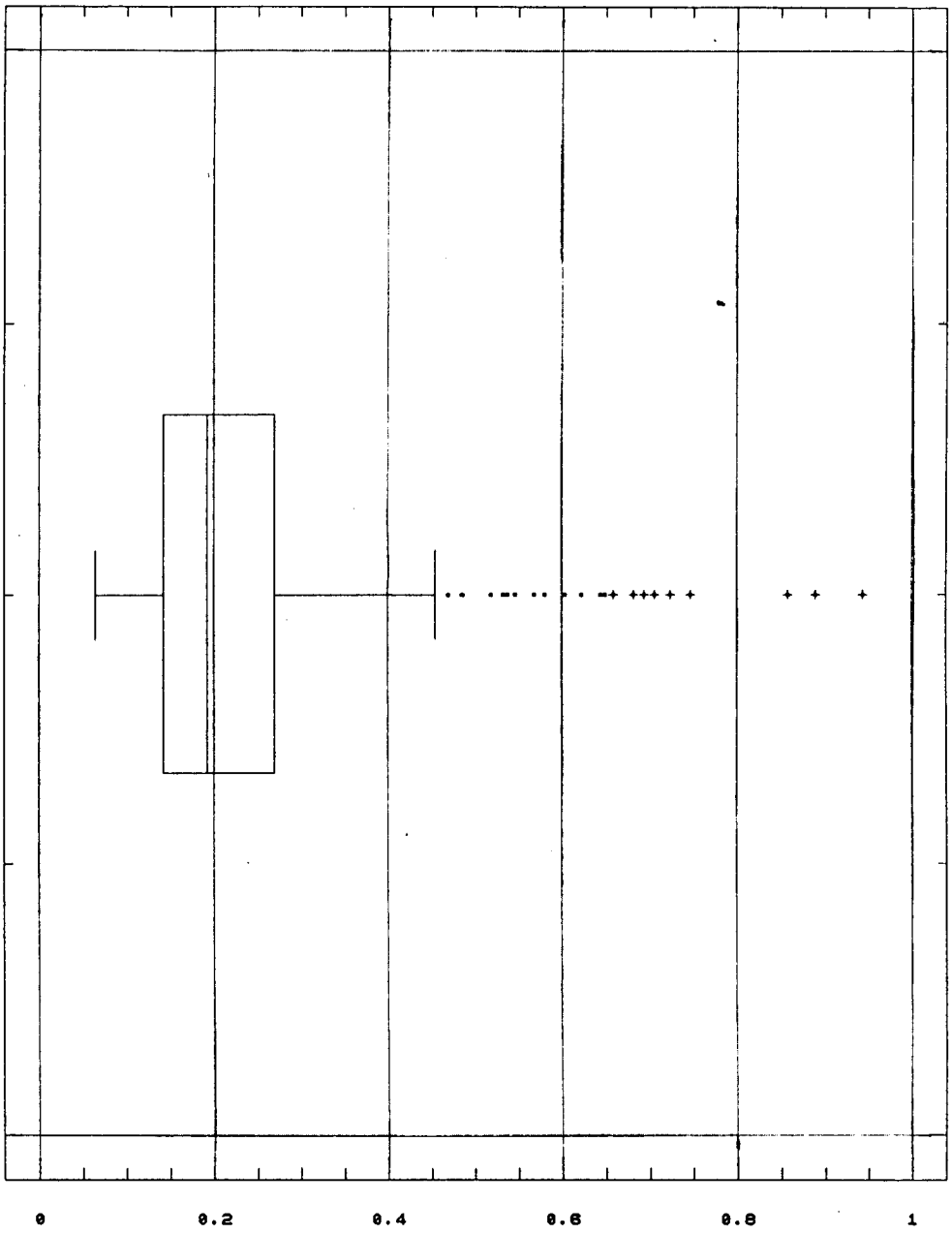



Figura 22. Representação dos resultados de 327 amostras de leite crú. (Método "Box and Whisker Plot" ).

de maior frequência na distribuição, situou-se em A = 0,149 (2,37 μg NANA/ml de leite). Comparados com o valor da média aritmética das 327 amostras, A = 0,230 (3,85 μg/ml) verifica-se que todas as demais medidas situaram-se abaixo desse valor, reafirmando o raciocínio global de que, para a situação estudada, a probabilidade da ocorrência de valores acima de A = 0,450 para leite de plataforma é realmente muito pequena. Entretanto, utilizando-se os dados da distribuição e levando a englobar quase que 100% dos resultados (99,73% com três desvios-padrão), obtem-se um valor aproximado de A = 0,600 (10,64 μg NANA/ml de leite) que, embora seja possível e pertencente à distribuição normal, ocorrerá com uma frequência praticamente insignificante em condições normais.

A definição do método objetiva a detecção de possíveis fraudes executadas sobre leite normal, conforme anteriormente referido. Uma fraude por adição de soro pode, tanto ser sutil quanto grosseira, todavia a tendência do fraudador é a de aproveitar-se da oportunidade e, consequentemente, tendendo ao exagero para assim tornar-se economicamente viável. Nesse aspecto, uma fraude sutil contribuirá muito pouco na elevação do teor de NANA livre e, dependendo do teor inicial de NANA livre no leite que sofreu a fraude, poderá situar-se dentro de valores considerados normais.

Assim, torna-se necessária a definição de pontos de corte visando a aplicabilidade do método, como em qualquer outra situação. Esses pontos de corte devem principalmente,

diferenciar um valor chamado negativo, isto é, normal ou não fraudado, de um valor chamado de positivo ou fraudado. Não há dificuldade na definição desses dois valores, pois, ao verificar-se a distribuição, pode-se afirmar que, com enorme probabilidade (99,73%), valores de A superiores a 0,600 (10,64 µg/ml) são positivos e, que valores inferiores a esse pertencem à distribuição e, portanto, seriam negativos. Todavia, tendo em conta a enorme variabilidade do teor de NANA livre para o leite considerado normal (plataforma) e a própria variabilidade da contribuição do soro industrial, verifica-se uma ampla região de resultados que, ou teriam um teor mais elevado de NANA livre ou que tenham sido fraudadas mais sutilmente. Esses resultados referem-se a valores compreendidos entre 75% (A = 0,267) e 100% (A = 0,600) da distribuição, onde os universos amostrais de fraudado e não fraudado mais se sobrepõem. Frente a resultados dessa natureza, nada pode ser afirmado categoricamente sem a análise de outras condições inerentes, podendo, no máximo, enquadrá-los como suspeitos.

Considerando que a metodologia está sendo proposta como um "*screening*" de plataforma, que é o local onde se seleciona toda a matéria-prima que entra numa indústria, o leite quando enquadrado na categoria de suspeito, deve receber um tratamento especial que não a simples condenação mas também não ser considerado absolutamente negativo. Faz-se necessário levantar a história de resultados desse leite ou quando isso não for possível, acompanhá-lo sistematicamente daí em diante. Para leites entregues em latões, provenientes diretamente de

produtores, torna-se fácil constatar a existência de causas interferentes como mastite, dia de ordenha, acondicionamento e transporte do produto. No entanto, isso torna-se impraticável quando o leite recebido provém de um outro estabelecimento, transportado em caminhões-tanque, resfriado há várias horas, oferecendo condições para o crescimento de microorganismos psicrotróficos proteolíticos, embora nesse caso tenha um fator positivo que é a mistura de grande número de produtores o que faz com que o resultado das análises tendam a se aproximar da média.

Baseado em tudo que foi exposto e como proposição de interpretação prática do método para análise do leite em plataforma, sugere-se classificar os leites em: negativo, suspeito e positivo, conforme Tabela 21.

**Tabela 21. Interpretação Prática do método da ninidrina ácida para análise de leite em plataforma industrial (Proposição).**

| Categoria | Absorvância * 470 nm | Concentração µg Nana livre/ml leite |
|---|---|---|
| Negativo | $\leq$ 0,300 | $\leq$ 5,14 |
| Suspeito | 0,300 < A $\leq$ 0,600 | 5,14 < C $\leq$ 10,64 |
| Positivo | > 0,600 | > 10,64 |

Legenda: A = Absosrvância C = Concentração
* Proposição de valores com ajustes aproximados.

Essa proposição reflete um mínimo de 80% de eficiência para o teste assim definido. Chegou-se a esse valor lançando mão do Coeficiente Global do Teste - CGT (CORTES, 1993), associação estatística que leva em consideração dois parâmetros fundamentais no estabelecimento da validade de um método, a sensibilidade e a especificidade, como pode ser observado na Tabela 22.

**Tabela 22. Qualificação do teste proposto de ninidrina ácida para determinação de ácido siálico como "screening" de plataforma, utilizando os resultados de fraude intencional de 5, 10 e 20% de adição de soro a leites autênticos.**

| Resultado do Teste | CONDIÇÃO DA AMOSTRA | | TOTAL |
|---|---|---|---|
| | Fraudada | Não Fraudada | |
| Positivo + Suspeito | 38 | 2 | 40 |
| Negativo | 12 | 18 | 30 |
| TOTAL | 50 | 20 | 70 |

$$\text{Sensibilidade do teste (verdadeiros positivos)} = \frac{38}{50} \times 100 = 76{,}0\%$$

$$\text{Especificidade do teste (verdadeiros negativos)} = \frac{18}{20} \times 100 = 90{,}0\%$$

$$\text{CGT - Eficiência do teste para a proposição} = \frac{56}{70} \times 100 = 80{,}0\%$$

Esses índices poderão ser modificados à medida que se aumentar o universo amostral e com isso alterar os limites de cada uma das categorias, principalmente, diminuindo a faixa de variação para os leites suspeitos e também na dependência da intenção dos controles oficiais.

# VI. Conclusões

Decorrente dos objetivos propostos, os resultados do presente trabalho permitem a obtenção de algumas conclusões inerentes a duas hipóteses fundamentais, quais sejam: primeira, a adaptação e padronização do método espectrofotométrico simples e rápido para a determinação quantitativa de ácido siálico em leite fluido e soro doce industrial e, segunda, a possibilidade de, como consequência, implementar um teste de plataforma objetivando a detecção de possíveis fraudes por adição de soro. Assim, respectivamente:

**A. - Quanto ao método:**

A.1. - Realizou-se a adaptação e padronização do método da Ninidrina Ácida (Reagente 2 de Gaitonde) para a determinação espectrofotométrica quantitativa de ácido siálico em leite fluido e soro, na região visível do espectro, a 470 nm, culminando pela definição do protocolo mostrado na página 77 .

A.2.- O método mostrou-se exato e preciso. Em condições ideais, exibiu um $r = 0,9996$ ($r^2 = 0,9992$) e equação $y = 0,0201 + 0,0109\ X$. A precisão, estimada por ensaios de repetibilidade, apresentou coeficiente de variação menor que 8% para duplicatas e de 7% para quadruplicatas.

A.3. - Frente à adição de soro, mostrou-se para uma situação ideal, com leite certificadamente autêntico, sensível a pequenas variações, ao redor de 2% de adição, elevando-se para 5% de adição para leites de plataforma; observou-se ainda, boa repetibilidade configurada por variabilidade sempre menor que a inerente ao próprio método.

A.4. - Aliado a essas características, o método configurou-se de fácil execução, com grande possibilidade de utilização rotineira por não envolver materiais e equipamentos sofisticados ou mão de obra qualificada, além de reduzir praticamente à metade, o tempo de obtenção dos resultados, quando comparado aos demais métodos que necessitam da hidrólise ácida a quente. O resultado de uma amostra é obtido em tempo ligeiramente superior a 60 minutos.

**B. - Quanto ao Teste de plataforma:**

B.1. - Preliminarmente , observou-se que o teor de ácido siálico difere significativamente ($P< 0,05$) entre leite

recém-ordenhado e o que chega às indústrias de laticínios. Verificou-se também, a interferência da pasteurização nesse teor.

B.2. - Comparado ao método oficial, o método proposto, além de mais simples e rápido, promove uma resposta quantitativa muito superior, com sensibilidade cerca de sete vezes maior para uma mesma quantidade de ácido siálico, que é facilmente comprovada pela análise da Figura 14 e pela comparação dos coeficientes de extinção dos comprimentos de onda correspondentes.

B.3. - A aplicação do método a 114 amostras de leite autêntico, resultou num teor médio de 2,71 ± 0,83 μg de ácido siálico livre por ml de leite. Para 56 amostras testadas de soro industrial, observou-se uma média de 42,35 ± 6,60 μg de NANA/ml, que, em termos médios, revelou-se 15,6 vezes o teor de NANA livre do leite autêntico.

B.4. - A ampliação do universo amostral do leite para 327 amostras, incluindo os resultados de plataforma, resultou numa elevação do teor médio de NANA livre para 3,85 ± 2,20 μg/ml, evidenciando também, uma enorme variabilidade.

B.5. - Das inter-relações estatísticas, pode-se definir uma proposição de teste rápido de " screening " para a detecção de fraude por adição de soro ao leite, classificando as amostras

em três categorias em função dos resultados, quais sejam: negativas, suspeitas e positivas.

B.6. - Da aplicação do teste assim definido a um total de 70 amostras, entre não fraudadas (20) e fraudadas (50) com 5, 10 e 20% de soro, observou-se uma especificidade de 90% e uma sensibilidade de 76%, configurando-se numa eficiência de 80% para o teste proposto.

# VII. Referências Bibliográficas


01 - AMINOFF, D. Methods for quantitative estimation of n-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J. 81: 384-91, 1961.

02 - ANUÁRIO ESTATÍSTICO: matérias-primas e produtos de origem animal. Brasília, Serviço de Inspeção Federal, 1985. 168p.

03 - ANUÁRIO ESTATÍSTICO: matérias-primas e produtos de origem animal. Brasília, Serviço de Inspeção Federal, 1986. 328p.

04 - AOKI,T.& KAKO,Y. The soluble and micellar k-casein in heated concentrated whey protein-free milk. Jap. J. Zootech. Sci. 56(4): 347-352, 1985.

05 - ARUMUGHAN, C.; CONTRACTOR, P.R.; SABARWAL, P.K. Heat induced changes in the carbohydrates levels of casein. Milchwissenschaft 347: 417-18, 1979.

06 - ATROSHI, F.; PARANTAINEN, J.; KANGASNIEMI, R.; SALONIEMI, H. Possible role of sialic acid in bovine mastitis with particular reference to milk electrical conductivity. J. Vet. Med.B 33: 620-27, 1986.

07 - BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento de inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal - RIISPOA. Brasília, DIPOA, 1974. 364p. (Decreto nº 30691 de 29/03/52 e Decreto nº 1259 de 25/06/72).

08 - BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria nº 124, 23 set 1991. Métodos de detecção de soro no leite. Diário Oficial, Brasília, p.26245-6, 20 nov 1991. Seção 1.

09 - BRUNNER, J.R. & THOMPSON, M.P. Some characteristics of the glyco-macropeptide of casein-A product of the primary rennin action. J. Dairy Sci. 42(11): 1881-83, 1959.

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

11 - CHRISTENSEN, T.M.T.E.; BECH, A.M.; WERNER, H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of

nitrogen components in cheese. Bull. I.D.F. 261: 4-9, 1991.

12 - CÓRTES, J.A. Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais. 1.ed. São Paulo, Livraria Varela Ltda., 1993. p.125-138.

13 - DIRKS, U. & REIMERDES, E.H. Methodology of analysis of buttermilk and skim milk. Report of an EEC working group. Lebens mittelchem. Gericht. Chem. 42(1): 3-7, 1988.

14 - EIGEL, W.N.; BUTLER, J.E.; ERNSTROM, C.A.; FARREL JR., H.M.; HARWALKAR, V.E.; JENNESS,R.; WHITNEY, R.Mcl. Nomemclature of proteins of cow's milk: fifth revision. J. Dairy Sci. 67: 1599-631, 1984.

15 - EWING, G.W. Métodos instrumentais de análise química. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, 1977. p.41-88.

16 - FOX, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. J. Dairy Sci. 72: 1379-400, 1989.

17 - FURTADO, M.A.M.; WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Quantificação de soro de queijo adicionado ao leite pasteurizado através da determinação do número de caseína. Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes 43(260): 3-11, 1988.

18 - FURTADO, M.A.M. Desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite pasteurizado. Lavras, 1989. 105p. Tese (Mestre em Ciência dos Alimentos) Escola Superior de Agricultura de Lavras.

19 - GAITONDE, M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring aminoacids. Biochem. J. 104: 627-33, 1967.

20 - GAJDUSEK, S. Free and bound sialic acid in cow's milk. Sb. UVTIZ,Potravin. vedy 5(4): 295-300, 1987.

21 - GOMES, F.P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1984. p.9-44.

22 - GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. J. Dairy Sci. 68: 531-40, 1985.

23 - GUÉRIN, J.; ALAIS, C.; JOLLES, J.; JOLLES, P. k-casein from bovine colostrum. Biochimica et Biophysica Acta 351: 325-32, 1974.

24 - HARPER, W.J. & SEIBERLING, D.A. Dairy technology and engineering. Connecticut, Ed.The Avi Publishing, 1976.

25 - HOFI, A.A.; ASKER, A.A.; HAMZAWI, L.F.; ABDEL-SALAM, M.H. Carbohydrate moiety of protein fractions from some mammals' milk. Asian J. Dairy Res. 1(2): 91-6, 1982.

26 - HOOYDONK, A.C.M.van & OLIEMAN, C. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. Neth. Milk Dairy J. 36(2): 153-158, 1982.

27 - JENNESS, R.; LARSON,B.L.; McMEEKIN,T.L.; SWANSON, A.M.; WHINAH, C.H.; WHITNEY, R.McL. Nomenclature of the proteins of bovine milk. J. Dairy Sci. 39: 536, 1956.

28 - JOLLÈS, P. & FIAT, A.M. The carbohydrate portions of milk glycoproteins. J. Dairy Res. 46: 187-191, 1979.

29 - JOURDIAN, G.W.; DEAN, L.; ROSEMAN, S. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids their glycosides. J. Biol. Chem 246(2): 430-435, 1971.

30 - KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Experimental immunochemistry. 2.ed. Illinois, Ed.Charles C. Tomas, 1971. p.510-537.

31 - KHALIFA, M.Y.; NIKI,R.; ARIMA,S. Studies on k-casein. II. Effect of k-casein heterogeneity on casein complex formation. J. Fac. Agric., Hokkaido Univ. 62(3): 256-68, 1985a.

32 - KHALIFA, M.Y.; NIKI,R.; ARIMA, S. Effect of heat treatments on k-casein. I. Heat-induced changes of k-casein fractions. J. Fac. Agric., Hokkaido Univ. 62(3): 283-301, 1985b.

33 - KONING, P.J. & ROOIJEN, P.J. Estimation of whey proteins in caseina co-precipitate or in mixtures with milk powder by the use of a modified ninhydrin reaction. Milchwissenschaft 26(1): 1-6, 1971.

34 - KUMOSINSKI, T.F.; BROWN, E.M.; FARRELL JR., H.M. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: k-casein. J. Dairy Sci. 74: 2879-87, 1991.

35 - LECHNER, E. & KLOSTERMEYER, H. Detection of the adulteration of skim milk powder by whey powder (polarografic method). Milchwissenchaft 36(5): 267-270, 1981.

36 - 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. J. Dairy Res. 58(3): 321-328, 1991.

37 - LOKO, R. Detection of whey in dried milk. A propos de la recherche de lactosérum dans les poudres de lait. Tech. Lait. 964: 23-27, 1982.

38 - LORENZ, W.; SCHUBERT, P.; HOFFER, H. Detection of dried whey in dried milk by the GMP method. Milchwirtsch. Ber. Bundesans Wolfpassing und Rotholz 72: 195-196, 1982.

39 - MARIANI, P.; RESMINI, P.; LOSI, G. Sialic acid content of total casein in relation to cow genotype at the k-CN locus. Atti Soc. Ital. Sci. Vet. 38: 410-12, 1984.

40 - MARIER, J.R.; TESSIER, H.; ROSE, D. Sialic acid as an index of the k-casein contend of bovine skimmilk. J. Dairy Sci. 46: 373-9, 1963.

41 - MEHRENS, H.A.; REIMERDES, E.H. Detection of whey in food using the k-casein macropeptide. Git Fachzeitsch. Laborat. 30(5): 406-9, 1986.

42 - MERCK Index (The): An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 10.ed. Rahway: Merck, Ed. Martha Windholz, 1983.

43 - MORRISSEY, P.A. The N-acetyl neuraminic-acid content of the milk of various species. J. Dairy Res. 40: 421-25, 1973.

44 - MOTTAR, J.; MERCHIERS, M.; VANTOMME, K.; MOERMANS, R. A colorimetric assay for the enzymic determination of sialic acid in milk. Lebensm. Unters. Forsch. 192(1): 36-9, 1991.

45 - OISHI, H.; YOKOYAMA, K. Effect of sialic acid residues on the properties of k-casein. Bull. Nippon Veter. Zootech. Coll. 31: 213-7, 1982.

46 - OLIEMAN, C.; BEDEM, J.W.VAN DEN. A sensitive HPLC method of detecting rennet whey total solids in skim milk powder. Neth. MIlk Dairy J. 37(1/2): 27-32, 1983.

47 - OLIVEIRA, J.S. Queijo:fundamentos tecnológicos. 2.ed. Campinas, Ed. UNICAMP, c1986. p.32-36. (Tecnologia de Alimentos).

48 - ORTIN-RODRIGUEZ, L.; SANCHEZ-ALGABA, T. Aplicación del metodo del acido sialico libre a leches en polvo y leches liquidas. Su valor en la determinación de la adición de suero de leche a leches de consumo. Alimentaria 212: 87-92, 1990a.

49 - ORTIN-RODRIGUEZ, L.; SANCHEZ-ALGABA,T. Gelación de la leche UHT: acido sialico libre e amoniaco. Alimentaria 213: 15-20, 1990b.

50 - PANETTA, J.C.; BARROS, V.R.M.; LAURENT, M.I.; MIGUEL, O.; ISIDORO, V.L.B. Fatores interferentes sobre a eficácia do método qualitativo utilizado para detecção de soro em leite de consumo. Rev.Inst. Lat. Cândido Tostes 42(253): 26-33, 1987.

51 - POTGIETER, C.M. The detection of added whey powder in milk powder. I. Investigation into the application of the free sialic acid method recommended by The European Economic Community. South Afr. J. Dairy Technol. 17 (2): 55-58, 1985.

52 - RAMPILLI, M.; RESMINI, P.; TRIPICIANO, V.; SADINI, V. Ricerca di siero presamico nelle polveri di latte e latticello. II. Controllo del latte destinato all'ammasso pubblico . Sci. Tec. lattiero-Casearia 36(1): 28-45, 1985.

53 - RANK, T.C.; GRAPPIN, R.; OLSON, N.F. Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. J.Dairy Sci. 68: 801-05, 1985.

54 - ROBITAILLE, G.; NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES, H.G. Variation in the N-acetyl neuraminic acid content of bovine k-casein. J. Dairy Res. 58: 107-14, 1991a.

55 - ROBITAILLE, G.; NG-KWAI-HANG, K.F.; MONARDES, H.G. Association of K-casein glycosilation with milk production

and composition in holsteins. J. Dairy Sci. 74: 3314-17, 1991b.

56 - SADINI, V. Analytical aspects of milk proteins. Activity of an EEC Commission Working Group. Dairy Ind. Int. 49(11):29-32, 1984.

57 - SADINI, V.; RAMPILLI, M. Ricerca di siero presamico nelle polveri di latte e di latticello. I. Considerazioni generali. Sci. Tec. Lattiero-Casearia 36(1): 10-27, 1985.

58 - SAITO, T.; YAMAJI, A.; ITOH,T. A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. J. Dairy Sci. 74: 2831-37, 1991.

59 - SAITO, T.; ITOH,T. Variations and distributions of O-glycosidally linked sugar chains in bovine k-casein. J. Dairy Sci. 75: 1768-74, 1992.

60 - SÃO PAULO. Lei nº 8078, 11 set. 1990. Código de Defesa do Consumidor. São Paulo, 1991. 135p.

61 - SERRINI, G.; LANZA-SERRINI, G.; MONFRINI, C. Determination of free sialic acid in skimmed milk rennet whey powders and their relative mixtures. Commission of the European Communities, 1981 EUR 7598 EN, 32pp.

62 - SHAMMET, K.M.; BROWN, R.J.; MAHON, D.J.Mc. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. J. Dairy Sci. 75: 1373-79, 1992a.

63 - SHAMMET, K.M.; BROWN, R.J.; MAHON, D.J.Mc. Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from k-casein. J. Dairy Sci. 75:1380-88, 1992b.

64 - SHING, L.N. & GANGULI,N.C. Status of casein in abnormal milk with particular reference to mastitis. Milchwissenschaft 30: 17-24, 1975.

65 - TOLLE, A.; BOOTH, J.; GROOTENHUIS, G.; HEESCHEN, W.; MADSEN, P.S. Recommended methods for somatic cell counting in milk. Bull I.D.F. 132: 5-16, 1981.

66 - VEISSEYRE, R. Lactologia técnica: caracteres, composición y estructura de la leche; trad. Jesus Ventanas Barroso. 3.ed. Zaragoza, Ed. Acribia, 1988. p.11-32.

67 - VREEMAN, H.J.; BOTH, P.; BRINKHUIS, J.A.; SPEK, C.van der Purification and some physicochemical properties of bovine k-casein. Biochim. Biophys. Acta 491 : 93-103, 1977.

68 - WARREN, L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 234(8): 1971-75, 1959.

69 - WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD,J.A. Fundamentals of dairy chemistry. 2.ed. Connecticut, The Avi Publishing, 1978. 929p.

70 - WHITNEY, R.Mcl.; BRUNNER, J.R.; EBNER, K.E.; FARREL JR, H.M.; JOSEPHSON, R.V.; MORR, C.V.; SWAISGOOD, H.E. Nomenclature of the proteins of cow's milk: fourth revision. J. Dairy Sci. 59(5): 795-815, 1976.

71 - WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Adição de soro ao leite em pó. Métodos de detecção. Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes 39(234): 3-10, 1984.

72 - WOLFSCHOON-POMBO, A.F.; PINTO, A.P.E.F. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. Cienc. Tecnol. Aliment. 5(2): 111-15, 1985.

73 - WOLFSCHOON-POMBO. A.F.; FURTADO, M.A.M. Detection of adulteration of pasteurised milk with whey by determination of casein-bound phosphorus and protein nitrogen content. Lebensm. Unters. Forsch. 188(1): 16-21, 1989.

74 - WONG, N.P.; JENNESS, R.; KEENEY,M.; MARTH, E.H. Fundamentals of dairy chemistry. 3.ed. New York, Ed. van Nostrand Reinhold, 1988.

75 - YAO, K.; UBUKA, T. Determination of sialic acids by acidic ninhydrin reaction. Acta Med. Okayama 41(6): 237-41, 1987.

76 - YAO, K.; UBUKA, T.; MASUOKA, N.; KINUTA, M.; IKEDA, T. Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. Anal. Biochem. 179: 332-5, 1989.