

## PESQUISA DE ADULTERAÇÃO EM LEITE UHT COMERCIALIZADO EM FRANCISCO BELTRÃO /PR, ATRAVÉS DA ANÁLISE QUANTITATIVA DE ÁCIDO SIÁLICO LIVRE E LIGADO À GLICOPROTEINA

Cristina Poll Biguelini<sup>1</sup>

### RESUMO

A quantidade de soro lácteo produzida depende do tipo de queijo e das técnicas de fabricação. Em média, utilizam-se dez litros de leite para a fabricação de um quilo de queijo. Ou seja, aproximadamente 75% a 85% do volume de leite destinado a fabricação de queijos resulta em soro. Como este subproduto contém metade do extrato seco do leite, quando é adicionado fraudulentamente ao leite fluido, gera diversos problemas, como alterações nutricionais e menor rendimento. A pesquisa objetivou avaliar a viabilidade de uso da técnica descrita na Instrução Normativa de número 68 do ano de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para detecção de ácido siálico em leite. Como resultados, encontrou-se em tal trabalho, uma média de  $3,09 \pm 0,59$  ug/mL de ácido siálico em leite *in natura*, sendo a amostra total composta de três coletas, em tanque de resfriamento de laticínio da região e analisada por 15 vezes, em dias alternados e em triplicatas, obtendo-se coeficiente de variação de 19%. Assim como o soro lácteo, composto por três coletas, no mesmo laticínio e derivado da produção do mussarela, que foi analisado 11 vezes, em dias alternados e em triplicata, alcançando média de  $37,66 \pm 2,8$  ug/mL de ácido siálico e coeficiente de variação de 7,4%. As amostras foram coletadas no mês de janeiro de 2011 de leite UHT, integral, desnatado e semidesnatado, comercializados na cidade de Francisco Beltrão/PR, onde se coletou 70 amostras de leite. Destas, 33 foram de leite integral, 33 de leite desnatado e quatro de semidesnatado. Concluiu-se que a média geral de ácido siálico encontrado (entre os tipos de leite) foi de  $5,47 \pm 1,5$ ug/mL, com coeficiente de variação de 27%. O leite integral apresentou teor de ácido siálico de  $5,63 \pm 1,63$  ug/mL, com coeficiente de variação de 27%. Nas amostras de leite desnatado, a média geral de ácido siálico ficou em  $5,29 \pm 1,5$  ug/mL, com coeficiente de variação de 29%. Destes, 63,63% apresentaram taxas abaixo de 5,14 ug/mL, e 36,36% ficaram dentro da margem de valores de 5,14 ug/mL a 10,64 ug/mL de ácido siálico. A média para o leite semidesnatado ficou em  $5,55 \pm 1,7$ ug/mL, tendo uma variação de 4,6 ug/mL a 7,4 ug/mL de ácido siálico, com coeficiente de variação de 23%. Neste grupo 50% das amostras apresentou índice de ácido siálico abaixo de 5,14 ug/mL (negativo) e 50% na margem de 5,14 ug/mL a 10,64 ug/mL (suspeito). Não foram detectadas amostras acima de 10,64 ug/mL de ácido siálico. Das análises físico-químicas realizadas no equipamento EKOMILK - gordura, extrato seco desengordurado, proteína, crioscopia, água e densidade – não se observou correlação significativa entre suas taxas e os valores de ácido siálico das amostras. Ou seja, valores de ácido siálico, suspeitos de adição de soro, não foram correlacionados com alterações significativas em outras variantes físico-químicas. Observaram-se alterações significativas nos teores de ácido siálico nos leites em relação à data de fabricação, pois quanto mais próximo da data de vencimento, maior o teor de ácido siálico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leite UHT(Ultra High Temperature); Soro; Glicomacropéptido.

### 1 INTRODUÇÃO

Manter a qualidade do leite para consumo humano é uma preocupação constante, tanto no Brasil, como em outros países. As legislações no setor de alimentos, relativas a adição de diversas substâncias ao leite, como por exemplo o soro lácteo, descrevem que caso ocorra tal adição, o produto final deverá ser denominado “bebida láctea” e não pode ser considerado leite (CARVALHO, 2009).

<sup>1</sup> Farmacêutica generalista. Pós graduada em Gestão da qualidade na tecnologia de alimentos. Mestranda em Geografia – UNIOESTE. E-mail: biguelini@gmail.com



No Brasil, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), estabelece que o produto leite não pode ser adicionado de quaisquer substâncias, caracterizando a adição uma adulteração intencional como fraude. Esta ação é classificada como crime hediondo e fica estabelecida a devida pena, tanto para os fraudadores, como para quem comercializa, expõe a venda, tem depósito para comercialização ou entrega à consumo o produto fraudado. Entre tais fraudes, encontra-se a por adição de soro de queijo ao leite, tanto cru, como pasteurizado, esterilizado ou em pó, uma vez que é estabelecido que o produto “leite” não pode conter sólidos de soro de queijo (BRASIL, 1952).

O soro de leite deriva da fabricação de queijo e caseína, tem cor amarelo-esverdeado e aspecto turvo, podendo ser doce ou ácido. Amplamente usado para fabricação de diversos produtos alimentícios, como na fabricação da ricota e tem um alto valor nutricional. Sua proteína pode ser isolada e usada como suplemento em dietas para melhoramento do rendimento esportivo em atletas. Mas, além dos usos corretos de aproveitamento deste subproduto das indústrias lácteas, existe também o uso irregular e ilegal, como no caso de sua adição ao leite, para aumentar o volume ou reduzir custos de produção (TULLIO, 2007).

Em decorrência do baixo custo do soro e por ser uma forma de aproveitamento desse subproduto residual da indústria queijeira, torna-se economicamente tentadora a adição do soro ao leite, como forma de aumento no volume, levando a uma concorrência desleal de mercado e prejudicando as empresas idôneas e o consumidor. Saliendo-se que este tipo de fraude é difícil de ser fiscalizada, embora diversos métodos tenham sido estudados e propostos para tal detecção (BRASIL, 1952).

O soro, mesmo não sendo prejudicial à saúde, quando adicionado ao leite, é considerado fraude ao consumidor. Outro problema advindo desta fraude, é que na fabricação do queijo, ocorre fermentação pela ação das bactérias lácticas, o que para o queijo é bom e necessário, mas para o leite é muito ruim, devido a fermentação bacteriana do leite, azedando-o mais rapidamente e diminuindo sua vida de prateleira, ocasionando necessidade de outras etapas fraudulentas para corrigir esta, como mascarar a acidez e eliminar bactérias (VELOSO, 2002).

A adição do soro lácteo ao leite é difícil de ser detectada. Vários métodos foram desenvolvidos para a detecção e quantificação de tal fraude, mas os mais

utilizados derivam da determinação do glicomacropéptido (GMP), que resulta da quebra da ligação peptídica da k-caseína entre aminoácidos específicos, o qual é removido com o soro (HARAGUCHI et al., 2008). Assim sendo, a determinação do ácido siálico em soro é útil, uma vez que sua concentração no GMP é alta, refletindo a quantidade de GMP presente.

Com o trabalho em questão, objetiva-se avaliar a viabilidade de aplicação da técnica descrita na Instrução Normativa nº 68 do ano de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que tem por base a determinação de ácido siálico (NANA) em leite, pesquisando e quantificando tal fraude em amostras de leite UHT, comercializadas na cidade de Francisco Beltrão/PR, para desta forma padronizar a metodologia descrita pela IN nº 68/2006; quantificar a adição de soro lácteo em leite UHT comercializado na cidade de Francisco Beltrão/PR e avaliar a qualidade físico-química do leite UHT e sua correlação com os índices de ácido siálico.

## **2 REVISAO DE LITERATURA**

### **2.1 Leite**

Leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos. De acordo com o artigo 475 do RIISPOA,

"Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda." (BRASIL, 1952).

Sendo considerado um alimento de grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo, como importante fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas. O que o torna um excelente meio para o crescimento de vários grupos de microrganismos desejáveis e indesejáveis (SOUZA et al., 1995).

#### **2.1.1 Leites esterilizados e UHT**

Conforme descrito no Decreto nº 2244/1997, artigo 519 do RIISPOA (BRASIL, 1952), o leite UHT ou longa vida é definido como:

“...sendo o leite homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, à temperatura entre 130°C/150°C, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas”.

## **2.2 Características físico-químicas do leite**

A avaliação físico-química do leite revela uma mistura homogênea, composta de lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, etc., que se encontram em emulsão (a gordura e as substâncias associadas), outras em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) ou dissolvidas (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, etc.) (PEREIRA, 2001)

O leite normal, segundo o artigo 476 da RIISSPOA e reforçado pela Instrução Normativa nº51/2002 do MAPA, é caracterizado com o teor de gordura mínimo de 3%, acidez entre 15- 20°D, densidade a 15°C entre 1,028 e 1,033 g/mL, lactose de no mínimo 4,3%, ESD (extrato seco desengordurado) de no mínimo 8,5% e EST (extrato seco total) de no mínimo 11,5%, índice crioscópico mínimo de (-0,55°C) e índice refratométrico do soro a 20°C mínimo de 37°Zeiss (BRASIL, 1952; 2002).

O leite bovino é composto de 87,3% de água e 12,7% de sólidos totais, distribuídos em 3,3 a 3,5% de proteínas totais, 3,5 a 3,8% de gordura, lactose, 4,9%; além de 0,7% de minerais e as vitaminas (BEHMER, 1999).

## **2.3 O soro lácteo**

O soro lácteo é o subproduto derivado da fabricação de queijos, da caseína ou de outros produtos lácteos acidificados, sendo composto por lactose, proteínas e sais, mas com apenas metade do extrato seco encontrado no leite. (ZADOW, 1997). O soro é composto basicamente por água e nela estão contidas as substâncias solúveis, como a lactose, proteínas solúveis, sais minerais e traços de gordura.

A adição de soro lácteo ao leite é considerada uma fraude, mas é permitida em alguns produtos alimentícios, como por exemplo, as bebidas lácteas que podem ser adicionados ou não de outros componentes como gordura vegetal, leites fermentados, fermentos lácteos e outros. Sendo classificada como fermentada quando a mistura de leite e soro sofre ação de microrganismos específicos e/ou é adicionada de leites fermentados (Brasil, 2005). Assim, a incorporação de soro na

fabricação das bebidas lácteas representa uma alternativa racional para seu aproveitamento (ALMEIDA et al., 2001).

## **2.4 Detecção da adição de soro lácteo ao leite**

As autoridades, tanto nacionais como internacionais, preocupam-se há décadas com a problemática das fraudes em leite, sendo as mais comuns a adição de água, o desnatamento parcial ou a adição de leite desnatado, e a adição de soro do queijo. Fraudes como a adição de água são facilmente detectadas pela análise de crioscopia e o desnate parcial ou a adição de leite desnatado é detectada pela análise do teor de gordura, ficando a maior problemática nas análises mais complexas, como a adulteração através da adição intencional de soro de leite, derivado da produção de queijos (PEREIRA, 2001).

No soro está presente o glicomacropéptido (GMP), que resulta da quebra da ligação peptídica da k-caseína entre aminoácidos específicos. Nesta quebra, forma-se a para-k-caseína que permanece nas micelas de caseína e o glicomacropéptido que fica no soro (VELOSO, 2002). A dificuldade de identificar tal fraude decorre da presença natural deste constituinte no leite, ligado a proteína caseína e, portanto, dentro de certa quantidade, sempre será encontrado no mesmo. Mas no processo de fabricação do queijo, ocorre a quebra da caseína e a liberação do glicomacropéptido para o soro, aumentando a concentração deste e demonstrando o porquê da existência de uma grande quantidade de GMP livre em sua composição.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Amostras**

#### **3.1.1 Leite “*in natura*” e soro lácteo industrial**

Para se quantificar o teor de ácido siálico no leite *in natura*, produzido na região de Francisco Beltrão, nos meses de novembro e dezembro de 2010 foram coletadas três amostras do tanque de resfriamento de um laticínio da região, constituindo-se em um pool dos leites de 850 produtores locais. As coletas se deram em períodos distintos, sendo a primeira no início do mês de novembro, a segunda na metade do mês de novembro e a terceira no início do mês de dezembro. As amostras foram analisadas repetidamente por cinco vezes, em triplicata.

O soro lácteo foi adquirido do mesmo laticínio e proveniente da produção de queijo mussarela, coletado três vezes juntamente ao leite. Analisou-se o soro por quatro vezes em dias alternados, na primeira e segunda coleta, e três vezes na terceira coleta, todos em triplicata, utilizando-se diluição 1:10 (1ml de soro em 9ml de água destilada), devido concentração esperada de ácido siálico ser acima do alcance da curva de calibração. As amostras de soro industrial foram submetidas a aquecimento a temperatura de 80°C por 15 minutos, em banho-maria, antes das análises.

### **3.1.2 Leite UHT**

A pesquisa se deu no período de novembro de 2010 a janeiro de 2011, sendo as amostras de leite UHT (integral, desnatado e semidesnatado) coletadas e analisadas no mês de janeiro de 2011, de forma aleatória e conforme as opções encontradas nos mercados. Todas as análises foram realizadas em triplicata, utilizando-se como valor final, o resultado da média encontrada para o valor de ácido siálico em ug/mL.

### **3.2 Quantificação de ácido siálico (nana) pelo método da ninhidrina ácida**

Empregou-se a metodologia de determinação de ácido siálico livre e ligado a glicoproteína do leite, descrita na IN/MAPA nº68/2006, também chamado de “método da ninhidrina ácida”, que tem por objetivo a quantificação de ácido siálico (N-acetilneuramínico) – proveniente do GMP - através do uso do reagente cromogênico ninhidrina ácida.

### **3.3 Caracterização físico-química do leite UHT**

As 70 amostras foram analisadas no aparelho EKOMILK (CAP LAB, 2008) para quantificar os índices de gordura, proteína, ESD, densidade, água e crioscopia. Assim como as amostras do ensaio de recuperação, também foram analisadas pelo equipamento. Avaliaram-se a correlação entre a data de fabricação das amostras de leite UHT e os índices de ácido siálico, separando as amostras em dois grandes grupos, onde o primeiro foi composto por amostras com até dois meses de fabricação e o segundo após dois meses de fabricação.

### **3.4 Avaliação do efeito da adição de soro lácteo sobre as variáveis físico-químicas**

Para avaliar a ocorrência de alterações nas variáveis físico-químicas: gordura, ESD, densidade, água, crioscopia e proteína, frente o aumento da quantidade de soro adicionada ao leite in natura, realizou-se em triplicata, um ensaio com adição de concentrações conhecidas de soro ao leite, com quantificação das taxas de ácido siálico e das variáveis físico-químicas, objetivando-se posterior estudo comparativo entre os dados levantados.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Dosagem de ácido siálico no leite cru *in natura* e no soro lácteo**

Na análise do leite puro foi obtida uma média de  $3,09 \pm 0,59$  ug/mL de ácido siálico. A amostra total foi composta de três coletas em tanque de resfriamento de laticínio da região. Destas, cada uma passou por uma repetição de cinco análises em dias alternados e em triplicata, obtendo-se ao final das 15 análises de repetição um coeficiente de variação de 19%.

As análises do pool de leites derivados de laticínio da região de Francisco Beltrão (bem como as do soro), após os cálculos de concentração, levam a um valor limite de detecção de 4,08 ug/mL de ácido siálico para amostras de leites in natura. Assim, valores acima de 4,08ug/mL seriam suspeitos de adição de soro.

### **4.2 Efeito da adição de soro sobre as variáveis físico-químicas**

Para verificar possíveis alterações nas variáveis físico-químicas (gordura, ESD, densidade, água, crioscopia e proteína), frente ao aumento da quantidade de soro adicionada ao leite in natura, realizou-se um estudo adicionando-se diferentes concentrações de soro ao leite.

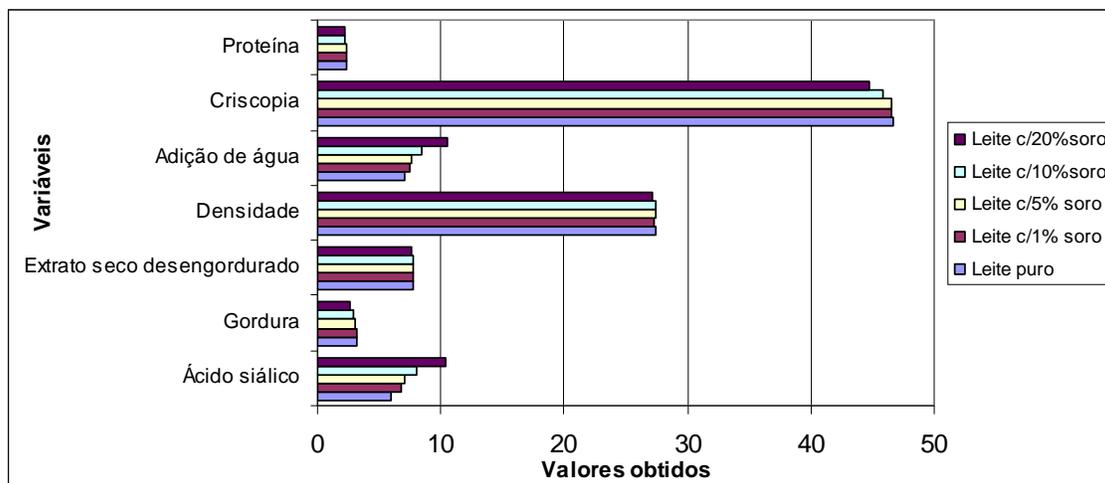


Gráfico 1: Efeito da adição de soro sob as variáveis físico-químicas

Inicialmente, quantificou-se o índice de ácido siálico do soro, obtendo-se valor médio de  $27,5 \pm 0,2$  ug/mL e no leite in natura que foi de  $3,81 \pm 0,2$  ug/mL.

Analisando-se as concentrações de ácido siálico obtidas e a variação dos parâmetros físico-químicos, através de comparativo entre os dados levantados, as mudanças observadas foram (gráfico 1):

- as taxas de ácido siálico obtiveram crescimento linear. Quando da adição de 1% de soro, foram para  $3,95 \pm 0,1$  ug/mL, com 5% soro alcançou  $4,91 \pm 0,4$  ug/mL, 10% de soro  $6,01 \pm 1,0$  ug/mL e finalmente com 20% foi de  $8,16 \pm 0,1$  ug/mL.
- no teor de gordura observou-se queda dos valores diante as adições de soro ao leite. De  $3,18 \pm 0,2\%$  no leite puro, foi para  $2,59 \pm 0,2\%$  quando da adição de 20% de soro. Assim como o extrato seco desengordurado (ESD), que obteve leve decréscimo de 0,17% da amostra de leite puro ( $7,79 \pm 0,06\%$ ) para a amostra de leite com 20% de soro.
- o teor de água e a crioscopia foram às mudanças mais expressivas, juntamente com o ácido siálico. O teor de água adicionada do leite puro, subiu de  $7,13 \pm 1,4\%$  para  $10,50 \pm 1,4\%$  no leite adicionado de 20% de soro. A crioscopia foi de  $46,7 \pm 0,8$  FP<sup>0</sup> para  $44,70 \pm 0,8$  FP<sup>0</sup>.<sup>2</sup>
- A densidade e a proteína não sofreram alterações significativas.

<sup>2</sup> O aparelho EKOMILK descreve para estes índices (água e crioscopia) uma margem de erro muito elevada (até 5%), não podendo se considerar tal item sem uma avaliação/contraprova em outro aparelho mais preciso, como no caso dos crioscópios.

#### **4.3 Correlação dos índices de ácido siálico com as variáveis físico-químicas**

Para testar se havia diferença significativa entre o leite tipo integral e o leite tipo desnatado, em relação à variável ácido siálico, foi realizado o teste *t*, onde se observou que não houve diferença significativa.

Em relação à variável ácido siálico e os três tipos de leites pesquisados: leite integral, desnatado e semidesnatado, para testar se havia diferença significativa, realizou-se o teste de análise de variância. O pressuposto da análise de variância foi aceito, ou seja, não foi rejeitada a hipótese de homogeneidade de variância, através do teste de *Levene* para tais variáveis. Observou-se, que não houve diferença significativa para os três tipos de leites, em relação à variável ácido siálico.

No caso dos leites integrais, observou-se que não há uma correlação entre a concentração de ácido siálico e as variáveis físico-químicas, embora o coeficiente de variação tenha mostrado alterações bastante distintas entre os dados, a variância foi baixa, chegando a 3,2 no teor de água e 2,4 para ácido siálico. Nos demais parâmetros a variância não alcançou 0,5.

Das 33 amostras de leite desnatado, obteve-se variações consideráveis nos índices de ácido siálico, teor de água e de gordura. Os valores de ácido siálico oscilaram de  $2,7 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$  a  $8,95 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ , com coeficiente de variação de 29%. A gordura teve uma média de  $0,09 \pm 0,07\%$  e variou de 0% a 0,16%, com coeficiente de variação de 76%, podendo ser correlacionado aos processos e padrões utilizados pelas diferentes indústrias. Os demais índices obtiveram variações mínimas de uma amostra para outra. O teor médio de água, que foi de  $2,00 \pm 2,1\%$ , apresentou um coeficiente de variação de 109,6%.

Nos leites semi desnatados, os índices encontrados nas quantificações realizadas, não obtiveram grandes oscilações. Embora a mostra número 3 demonstre um maior índice de crioscópio, de densidade e de ácido siálico. Os valores analisados não se correlacionam, ou seja, quando aumentou o ácido siálico, não aumentou a densidade e/ou a crioscopia, etc. Ocasionalmente tais dados ocorrem, mas sem correlação significativa. Também se foi observado que o número de amostras de leite semidesnatado foi muito pequeno, não perfazendo uma amostra representativa.

#### 4.4 Avaliação da qualidade físico-química do leite UHT pesquisado, através das análises de gordura, densidade, proteína, extrato seco desengordurado, crioscopia e água

A média geral para ácido siálico foi de  $5,47 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ , com coeficiente de variação de 27% (Gráfico 2) Para o item gordura, as amostras apresentaram teor médio de  $1,67 \pm 1,6\%$ , com coeficiente de variação de 96%, salientando-se que foram pesquisados três tipos de leite (integral, desnatado e semidesnatado).

O extrato seco desengordurado (ESD) teve valor médio de  $8,57 \pm 0,65\%$ , com coeficiente de variação de 7%.

A densidade média foi de  $1,032 \pm 3,8 \text{ g/mL}$ , com coeficiente de variação de 0,3%.

A taxa de água adicionada teve média de  $3,59 \pm 2,5\%$ , com coeficiente de variação de 70%, e a crioscopia teve média de  $49,22 \pm 1,9 \text{ FP}^\circ\text{C}$  ( $-0,510^\circ\text{H}$ ), o que corresponderia a uma taxa de adição de água 3,87% - coerência de dados entre os parâmetros do equipamento, mas desconsiderado tais resultados devido margem de erro do aparelho Ekomilk para tais parâmetros ser muito grande (5%).

A taxa de proteína média foi de  $2,91 \pm 0,45\%$  (dentro do preconizado pela legislação), com coeficiente de variação de 15%.

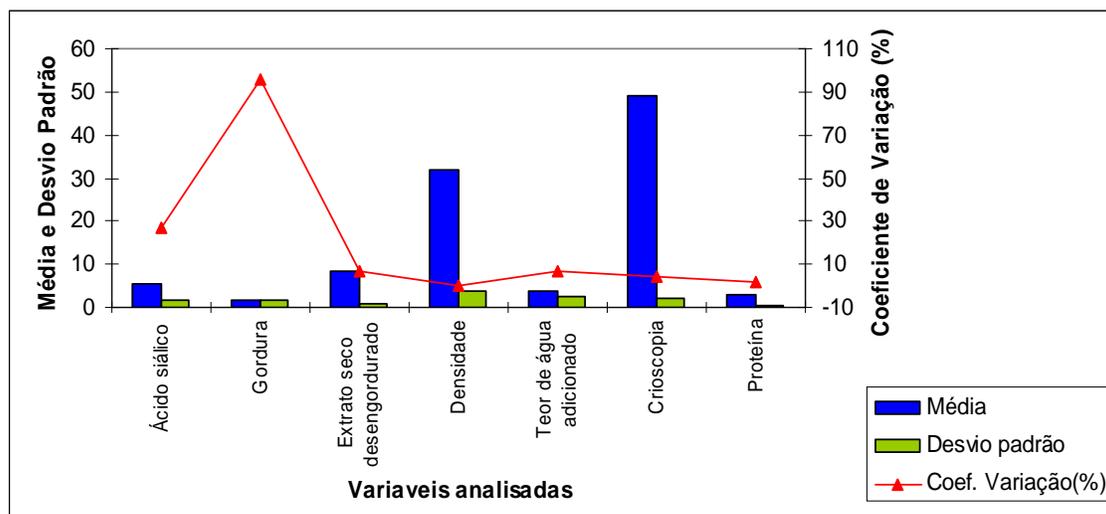


Gráfico 2: Médias obtidas nas análises das 70 amostras pesquisadas

Para os índices físico-químicos avaliados através do EKOMILK, encontram-se parâmetros legais, no referente a leite UHT, na Portaria/MAPA nº146/96. E mesmo assim, somente dois itens são normatizados: a gordura e o ESD. Para leites

integrals, o teor mínimo de gordura deve ser de 3% e o ESD mínimo de 8,2%. Leites semidesnatados devem conter de 0,6 a 2,9% de gordura, e ESD mínimo de 8,3% e para os leites desnatados, somente são permitidos no Máximo 0,5% de gordura e ESD de 8,4%. Na IN/MAPA nº 51/2002, fica estabelecido a crioscopia permitida a leites pasteurizados de - 0,530°H(- 0,512°C).

#### **4.5 Quantificação da presença de soro nas amostras de leite UHT pesquisadas**

##### **4.5.1 Análise de ácido siálico em leite UHT integral**

O valor médio de ácido siálico, encontrado nas 33 amostras de leite UHT integral, foi de 5,63±1,6 ug/mL, com coeficiente de variação de 27% (gráfico 5). Destas, 48,48% apresentaram valor de ácido siálico abaixo de 5,14ug/mL, que segundo Fukuda (1994), corresponderia a valores negativos para presença de adição de soro de queijo ao leite, e 51,51% apresentaram valores entre 5,14ug/mL a 10,64ug/mL, representando valores tidos como suspeitos de adição de soro ao leite (FUKUDA, 2003). Valores acima de 10,64 ug de ácido siálico/mL não foram detectados nas amostras analisadas.

##### **4.5.2 Análise de ácido siálico em leite UHT desnatado**

Foram analisadas 33 amostras de leite desnatado, onde a média geral dos índices de ácido siálico ficou em 5,29 ±1,5ug/mL, com coeficiente de variação de 29%. Destas 33 amostras, 63,63% apresentaram taxas de ácido siálico abaixo de 5,14 ug/mL, e 36,36% ficaram dentro da margem de valores de 5,14 a 10,64 ug/mL de ácido siálico. Não foi detectado valor acima de 10,64 ug/mL de ácido siálico.

##### **4.5.3 Análise de ácido siálico em leite UHT semidesnatado**

A média de ácido siálico para o leite semidesnatado ficou em 5,55±1,7 ug/mL, tendo uma variação que foi do 4,6 ao 7,4 ug/mL. Com coeficiente de variação de 23%.

A variância dos resultados foi 1,6, considerando-se como baixa. Cinquenta por cento das amostras apresentaram índice de ácido siálico abaixo de 5,14 ug/mL(negativo) e cinquenta por cento entre 5,14 ug/mL a 10,64 ug/mL (suspeito). Nenhuma amostra apresentou valor acima de 10,64 ug/mL (positivo).

#### **4.6 Correlação entre as datas de fabricação dos leites UHT pesquisados e os índices de ácido siálico**

Para avaliar o fator físico temperatura, como inibidor da problemática da proteólise do leite, que teoricamente tende a aumentar com proximidade a data de validade, estudou-se sua correlação com o aumento nas taxas de ácido siálico, observando-se diferença significativa entre as datas de fabricação. Separaram-se as amostras em dois grupos, onde o primeiro ficou com as amostras de até dois meses de fabricação e o segundo, as acima de dois meses. Utilizou-se o teste  $t$ , que apresentou diferença significativa das datas de fabricação para tal variável.

Observou-se que quanto mais velho o leite, maior sua taxa de ácido siálico, fator este discutido por Carvalho (2009) e Lasmar (2007), que relatam diversos fatores relacionados com a matéria prima, independentemente da metodologia utilizada na análise, que podem ser listados como contribuintes para a obtenção de eventuais resultados falso-positivos, como resfriamento, composição, mastite, tempo e forma de armazenamento.

### **5 CONCLUSÕES**

Analisou-se 70 amostras de leites UHT comercializados em mercados da cidade de Francisco Beltrão/PR, utilizando a metodologia de análise espectrofotométrica descrita na IN/MAPA nº68/2006, para quantificação de ácido siálico livre e ligado a glicoproteína, avaliando sua utilização e viabilidade no uso rotineiro. Pesquisou-se também a qualidade físico-química do leite, através do aparelho EKOMILK e sua possível correlação com as concentrações de ácido siálico.

A viabilização da metodologia de quantificação de ácido siálico se deu inicialmente através da elaboração da curva de calibração. Posteriormente nos ensaios de recuperação, onde se observou que quando da adição intencional de soro ao leite, ocorre correlação entre as variâncias teor de água adicionada, crioscopia e taxas de ácido siálico, ficando a indagação de que as amostras de leite UHT pesquisadas na realidade não apresentaram taxas de ácido siálico aumentadas por adição de soro e sim por outras alterações, como proteólise, por exemplo, pela provável existência de psicotróficos na matéria-prima, entre outros.

A média do teor de ácido siálico de um pool dos leites de 850 produtores locais foi de  $3,09 \pm 0,59$  ug/mL e o soro lácteo,  $37,66 \pm 2,8$  ug/mL de ácido siálico.

Nas amostras de três tipos de leite UHT pesquisados, a média geral de ácido siálico foi de  $5,47 \pm 1,5$  ug/mL, com coeficiente de variação de 27%. Destes, 63,63% apresentaram taxas abaixo de 5,14 ug/mL (normais), e 36,36% ficaram dentro da margem de valores de 5,14 a 10,64 ug/mL (suspeitos). Não foram detectadas amostras com valores de ácido siálico acima de 10,64 ug/mL (positivos).

Separando os leites por sua composição, obtiveram-se valores distintos para os índices físico-químicos, mas semelhantes no teor de ácido siálico. O leite UHT integral apresentou  $5,63 \pm 1,63$  ug/mL de ácido siálico, com coeficiente de variação de 27%. No leite UHT desnatado, a média geral ficou em  $5,29 \pm 1,5$  ug/mL de ácido siálico, com coeficiente de variação de 29%. A média, para as amostras de leite UHT semidesnatado, ficou em  $5,55 \pm 1,7$  ug/mL de ácido siálico, tendo uma variação que foi do 4,6 ug/mL ao 7,4 ug/mL e coeficiente de variação de 23%.

Das análises físico-químicas realizadas no aparelho EKOMILK – gordura, extrato seco desengordurado, proteína, crioscopia, água e densidade – não se observou correlação significativa entre suas taxas e os valores de ácido siálico. Ou seja, quando o ácido siálico apresentou valores considerados suspeitos de adição de soro, não se observou que outra variante físico-química tenha sofrido alteração significativa, correlacionando-os.

Ressalta-se que a legislação determina um índice máximo de 1% na adição de soro ao leite (BRASIL, 1991) – 1 mL/100 mL, mas em tal metodologia, segundo FUKUDA (1994), deve-se avaliar a média de ácido siálico nos leites e soros da região, para normatização do índice máximo permitido. Assim, as amostras do pool de leite derivado de laticínio da região, bem como as de soro, levam a um valor limite de 4,08 ug/mL de ácido siálico em leites in natura. Ou seja, leites com valores acima de 4,08 ug/mL seriam suspeitos de adição de soro. Como a pesquisa se deu sob amostras de leite UHT comercializadas na cidade de Francisco Beltrão, e destes leites, nem todos são compostos por leites da região, tal referência de valores não serve como indicador local.

Observa-se que frente a tais fatos, mantém-se a sugestão para uma nova pesquisa sobre os índices de ácido siálico nos leites da região, utilizando-se de tal

método de análise, mas em amostras de leite de “saquinho”, os barriga-moles, por derivarem de produção local, na sua grande maioria.

Salienta-se que tal método pode ser empregado para a determinação quantitativa do ácido siálico em leite, uma vez que se mostrou um método sensível e com boa precisão. Uma vantagem é que este método é de baixo custo e pouco impacto ambiental. Concluindo-se que o método proposto e validado, pode ser utilizado na análise de rotina para o controle de qualidade deste tipo de alimento (e muitas vezes matéria-prima para outros alimentos), que é o leite.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A. ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 21, n.2, 2001.

BEHMER, M.L. **Tecnologia do leite**. 13ª ed. São Paulo: Nobel. 1999.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006: Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Brasília, DF, 14/12/2006, Seção 1, Página 8.

BRASIL. Portaria nº. 124 de 23 set. 1991. Aprova os métodos analíticos qualitativo e quantitativo de detecção de soro em leite. **Diário Oficial da União**, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento, Brasília, DF, 20 nov. 1991.

BRASIL. Instrução Normativa nº51 de 18 set. 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União** Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Brasília, DF, 20 set. 2002.

BRASIL. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos origem animal - RIISPOA. Decreto nº 30.691, 29 mar. 1952. **Diário oficial da união**, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Alterado pelos Decretos nº 1236 de 02/09/1994, nº 1812 de 08/02/1996, nº 2244 de 04/06/1997, nº 6385 de 27/02/2008. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14013>>, Acesso em: 04 fev. 2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de Identidade e qualidade de bebidas lácteas. Ministério da agricultura, pecuária e do abastecimento. secretaria de inspeção de produto animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 24 de agosto de 2005.

CARVALHO, B.M.A.; CARVALHO, L.M.; ALCÂNTRA, L.A.P.; BONOMO, R.C.F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista electrónica de Veterinária**, v.8, n.6, 7p., 2007. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060704.pdf>>. Acesso em: 10 de outubro de 2009.

CAP LAB. **Manual de instruções/usuário do aparelho EKOMILK.** São Paulo: 2008.

FUKUDA, S.P., ROIG, S.M., PRATA, L.F. Aplicação do método da ninhidrina ácida como teste de screening de plataforma para detecção da adição de soro ao leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 16, n. 1. São Paulo: 1996.

FUKUDA, S. P. **Estudo da correlação entre o método da ninhidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite.** 2003. 102 f. Tese (Doutorado) - Unicamp, Campinas, 2003.

HARAGUCHI, F. K; ABREU, W. C; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição.** Campinas: Núcleo de Editoração SBI/CCV, 2008. Disponível em: < <http://www.vitafor.com.br/artigos/wheyprotein.PDF>>, extraído em 11.03.2011.

LASMAR, M.M. **Deteção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência, em amostras de leite cru conservadas em bronopol.** 2007. Dissertação de Mestrado - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 2007.

MARTINS, F.O., SILVA, C.A. DE O, CAMPOS, M. E. M., ANTUNES, V.C., MILAGRES, M. P.; BRANDÃO, S. C. C. **Avaliação da composição na qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em leite UHT.** Disponível em:

<<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p043.pdf>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2011.

PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; SILVA, P. H. F. **Físico-química do leite e derivados** – Métodos analíticos. 2ªed. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, 2001.

SOUZA, M. R., RODRIGUES, R., FONSECA, L. M., CERQUEIRA, M. M. O. P. Pasteurização do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária-UFMG**, n. 13, Minas Gerais: 1995.

TULLIO, L.T. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro do leite.** Dissertação de mestrado, do programa de pós-graduação strictu senso em Tecnologia de Alimentos. UFPR, Curitiba: 2007.

VELOSO, A.C.A., et al. Deteção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Revista Química Nova**, v.25, n.4, São Paulo: 2002.

ZADOW, J.G., **Modern dairy technology: advances in milk processing.** v. 2. London: Elsevier, 1997.