

AVALIAÇÃO DO TEOR DE CASEÍNOMACROPEPTÍDEO (CMP) NOS LEITES CRU E UAT AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO

Elaine Closs* ; Cláucia Fernanda Volken de Souza.

Centro Universitário UNIVATES.

Resumo: Com a implantação de resfriadores para armazenamento do leite cru nas propriedades rurais com o objetivo de inibir o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos que produzem ácido láctico, criou-se um ambiente favorável para outro grupo de micro-organismos capazes de se desenvolverem no leite refrigerado, as bactérias psicotróficas aeróbias. A proteólise promovida por psicotróficos é preocupante para a indústria láctea já que pode indicar um falso positivo de adição fraudulenta de soro de queijo ao leite cru. O presente trabalho avaliou a influência do tempo de armazenamento sobre a presença de caseinomacropéptido (CMP) no leite cru durante o armazenamento na indústria e no leite ultra alta temperatura (UAT) ao longo de seu período de vida útil, comparando três métodos de quantificação. O teor de CMP foi determinado pelo método cromatográfico e pelos métodos espectrofotométricos na região do visível que utilizam a ninidrina ácida e o reativo Erlich para quantificação do ácido siálico. Observou-se um aumento do teor de CMP ao longo do período de armazenamento, tanto para o leite cru refrigerado quanto para o leite UAT, ambos não adicionados de soro de queijo. Os métodos espectrofotométricos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,97 com o método cromatográfico estabelecido pela legislação brasileira vigente. Os resultados obtidos indicam que o método espectrofotométrico com ninidrina ácida pode ser utilizado como método alternativo para determinação de CMP em amostras de leite.

Palavras-chave: Leite; Caseinomacropéptido; Soro de queijo; Psicotróficos; Proteólise.

Evaluation of the caseinomacropéptide (CMP) content in raw and uht milk during storage time: Coolers are used in raw milk storage in order to inhibit the growth of lactic acid producer mesophilic microorganisms. However, refrigerated milk is a favorable environment to psychrotrophic aerobic bacteria growth. These psychrotrophic bacteria promote proteolysis which is of concern to the dairy industry since it may indicate a false positive of fraudulent addition of whey to raw milk. This study evaluated the influence of storage time on the presence of caseinomacropéptide (CMP) in raw milk during storage as well as in ultra-high temperature milk (UHT) throughout its shelf life. Three different determination methods were compared each other, namely the standard chromatographic method and two spectroscopy methods for the quantitative determination of sialic acid. One is based on the determination of ninhydrin acid and the other one is an adapted method using the Ehrlich reagent. An increase of CMP content throughout the storage period for the cooled raw milk and UHT milk was detected despite the fact that none had cheese whey. The spectrophotometric methods showed correlation coefficients greater than 0.97 with the chromatographic method established by Brazilian legislation. The results indicate that the spectrophotometric method using the ninhydrin acid can be used as an alternative method for the determination of CMP in milk samples.

Keywords: Milk; Casein macropéptide; Cheese whey; Psychrotrophic; Proteolysis.

* E-mail: laineccloss@hotmail.com

1 Introdução

Por sua composição, o leite é considerado um dos alimentos mais completos nutricionalmente e fundamentais para a dieta humana, e pela mesma razão, constitui num excelente substrato para o desenvolvimento de uma grande diversidade de micro-organismos, inclusive os patogênicos. A contaminação do leite nas diversas etapas da sua produção é uma preocupação constante das indústrias e dos órgãos de inspeção com os objetivos de: proteger a saúde do consumidor, evitar as perdas da qualidade físico-química e sensorial e reduzir os prejuízos econômicos decorrentes das alterações do produto (TRONCO, 2010). A refrigeração tem sido adotada em todos os estágios do processamento de leite na indústria. A introdução de tanques isotérmicos na propriedade possibilita a estocagem do leite de diversas ordenhas. As descentralizações dos postos de leite permitiu seu transporte em caminhões tanques por longas distâncias. Dessa forma, os problemas relacionados ao desenvolvimento da microflora mesófila foram reduzidos. No entanto, essa condição favorece o desenvolvimento dos micro-organismos psicotróficos (FUKUDA, 2003).

Os micro-organismos psicotróficos crescem a uma temperatura de 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. As bactérias psicotróficas incluem vários gêneros como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* e *Achromobacter* (EMBRAPA, 2003). A maioria das bactérias psicotróficas não são patogênicas, mas podem produzir uma série de alterações no leite, inclusive podendo provocar uma proteólise descontrolada, que ocasiona problemas de textura, além de sabor e aroma desagradáveis (FUKUDA, 2003). A presença dos psicotróficos é bastante preocupante, uma vez que as enzimas produzidas por esse tipo de micro-organismo são termorresistentes, e portanto continuam provocando alterações no produto mesmo após o tratamento térmico (TRONCO, 2010).

A quimosina, enzima utilizada na produção de queijos, hidrolisa a k-caseína do leite especificamente nas ligações 105-106, dando origem a dois diferentes peptídeos, a para-k-caseína (fragmento 1-105) que fica retido no queijo e o caseinomacropéptido (CMP) (fragmento 106-169) que permanece solúvel no soro de queijo (MAGALHÃES, 2008; CARVALHO *et al.*, 2007). De acordo com MAGALHÃES (2008), o caseinomacropéptido é também conhecido como glicomacropéptido (GMP), caseínoglicomacropéptido (CGMP), ou peptídeo derivado da caseína (CDP). Denomina-se de GMP a forma glicosada devido ao seu elevado conteúdo de carboidratos e de CMP a forma não glicosada do peptídeo (TULLIO, 2007).

A determinação do CMP, por se tratar de um componente específico do soro de queijo e que deve estar ausente no leite, é empregada para indicar fraude

pela adição de soro no leite (CARVALHO *et al.*, 2007). A legislação brasileira através na Instrução Normativa Nº 69 preconiza que, somente o leite que apresentar índice de CMP de até 30 mg.L⁻¹ poderá ser destinado ao abastecimento direto (BRASIL, 2006b).

A atividade proteolítica de enzimas termorresistentes, liberadas por bactérias psicotróficas, em leite cru e as que permanecem ativas em leite UAT (ultra alta temperatura) podem acarretar na liberação e surgimento de certa quantidade de CMP. Isso devido à capacidade destas enzimas proteolíticas hidrolisarem a caseína em ligações peptídicas semelhantes às hidrolisadas pela quimosina (MAGALHÃES, 2008), que resulta num falso positivo de adição fraudulenta de soro de queijo em leite.

A partir disso, a iniciativa desse trabalho justifica-se pela necessidade da avaliação contínua da qualidade do leite comercializado e consumido pela população, o qual deve conter os nutrientes estabelecidos pela legislação vigente e não conter nenhum tipo de adulteração que possa prejudicar os consumidores. Portanto o objetivo deste trabalho foi quantificar o teor de CMP em leite cru refrigerado e leite UAT ao longo do tempo de armazenamento, comparando três diferentes métodos de determinação.

2 Materiais e Métodos

Todos os meios de cultura utilizados foram Oxoid (Basingstoke, England). O padrão de CMP utilizado foi da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Todos os solventes e demais reagentes foram da Merck (Darmstadt, Germany).

2.1 Amostragem

Para a realização das análises foram coletadas amostras de leite cru refrigerado de 3 diferentes procedências e leite UAT de 3 diferentes datas de produção. As amostras de leite cru refrigerado de cada procedência foram genericamente identificadas como A, B e C e de leite UAT de cada produção como D, E e F. Para o leite cru refrigerado considerou-se a coleta na sua chegada à indústria como ponto de partida e para o leite UAT a data de sua produção.

O leite cru das três origens foi mantido estocado em diferentes silos de resfriamento da indústria e amostras de cada procedência foram coletadas no silo de estocagem logo após o recebimento e após 24 e 48 horas de armazenamento. Para o leite UAT foram coletadas amostras de cada data de produção logo após o envase e durante o seu período de vida útil, um, dois, três e quatro meses. Dessa forma, foram analisadas 9 amostras de leite cru refrigerado e 15 amostras de leite UAT.

2.2 Análises Microbiológicas

As amostras de leite cru refrigerado foram submetidas às análises microbiológicas de contagem global e psicotróficos utilizando-se os métodos de contagem em placa de petri preconizados pelo Manual do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA (BRASIL, 1981). As análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Determinação de CMP

Para determinar o índice de caseínomacropéptido proveniente da ação proteolítica de enzimas no leite cru e UAT utilizou-se o método de determinação e quantificação por cromatografia por exclusão com detector UV, estabelecido como método oficial pela Instrução Normativa Nº 68 (BRASIL, 2006a).

Também empregou-se para determinação de CMP o método baseado na determinação espectrofotométrica, que utiliza a ninidrina ácida, oficializado através da Instrução Normativa Nº 22 (BRASIL, 2003).

Além dos métodos quantitativos oficiais, utilizou-se a metodologia qualitativa de detecção de soro de queijo que utiliza o reativo de Erlich da Portaria Nº 124 (BRASIL, 1991). Esse método foi adaptado, submetendo-se as amostras a uma determinação espectrofotométrica quantitativa após a reação de complexação.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3.1 Método de determinação e quantificação por cromatografia

Para o preparo das amostras 10 mL de ácido tricloroacético 24 % foram adicionados gota a gota, sob agitação constante, em 20 mL de leite. Após, deixou-se em repouso por 60 minutos a temperatura ambiente e em seguida filtrou-se em papel qualitativo.

A determinação foi realizada com injeção de 20 mL do filtrado no cromatógrafo modelo 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) com detector UV na faixa de 205 nm, coluna hidrofílica Zorbax GF-250 9,4 mm x 250 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). A fase estacionária era composta por partículas de sílica esféricas com diâmetro nominal de 4 a 4,5 µm, superfície modificada estabilizada com zircônio, diâmetro do poro 150 Å, área superficial de 140 m²/g. Como fase móvel utilizou-se uma solução tampão de fosfato pH 6,0. O volume de injeção foi de 20 µL e fluxo da fase móvel de 2 mL/min.

Para determinação de CMP por CLAE foi elaborada uma curva de calibração, preparada utilizando-se leite cru recém ordenhado e genuíno, livre de adição de soro e/ou sem proteólise devido ação de psicotróficos. Para

o seu preparo o padrão de CMP foi diluído em leite nas concentrações de 0, 10, 30, 50, 75 e 100 mg.L⁻¹, de acordo com o recomendado pela metodologia oficial (BRASIL, 2006a). A partir dessas soluções, construiu-se o gráfico da concentração de CMP em mg.L⁻¹ versus altura do pico detectada, calculando-se a equação da reta de regressão, aceitando-se valores de R próximos de um.

2.3.2 Determinação espectrofotométrica do ácido siálico

2.3.2.1 Método da ninidrina ácida

Para a determinação espectrofotométrica de CMP utilizando a ninidrina ácida foi empregado o método oficializado através da Instrução Normativa Nº 22 (BRASIL, 2003).

Para o preparo das amostras, adicionou-se a 10 mL de leite, a mesma quantidade de ácido tricloroacético 24 %. Em seguida as amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos e logo após submetidas a filtração em papel quantitativo. Na etapa seguinte adicionou-se 1 mL de ácido fosfotúngstico 20 % ao filtrado. Após centrifugou-se a 3500 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante adicionando-se ao resíduo 6 mL de álcool etílico 95 %. Centrifugou-se mais uma vez por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se sobre o resíduo 2 mL de ácido acético glacial e 1 mL de solução de ninidrina ácida. Os tubos foram mantidos em bloco aquecedor a 80 °C por 10 minutos e após resfriados a temperatura ambiente. Para determinação da concentração de CMP submeteu-se as amostras a leitura em espectrofotômetro modelo DR 2700 (Odyssey Hatch, Loveland, EUA) a 470 nm.

Para a quantificação do CMP preparou-se uma curva padrão a partir de leite cru recém ordenhado e genuíno, livre de adição de soro e/ou sem proteólise devido ação de psicotróficos com as concentrações de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 mg.L⁻¹ de padrão de CMP. Essas soluções foram submetidas as mesmas etapas descritas acima. A partir dessas soluções, construiu-se o gráfico de concentração de CMP em mg.L⁻¹ versus absorvância a 470 nm. A partir do qual se calculou a regressão linear da curva aceitando-se valores de R próximos de um.

2.3.2.2 Método do reagente Erlich

Para a determinação espectrofotométrica de CMP com complexante Erlich empregou-se o método da Portaria Nº 124 (BRASIL, 1991).

Para o preparo das amostras, adicionou-se a 25 mL de leite, a mesma quantidade de ácido tricloroacético 24 %. Após as amostras permaneceram em repouso por 30 minutos e foram filtradas em papel quantitativo. Ao filtrado adicionou-se 1 mL de ácido fosfotúngstico 20

%, deixando novamente descansar por 10 minutos. Após centrifugou-se a 3000 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao centrifugado 5 mL de etanol 95 %. Novamente centrifugou-se por 10 minutos, descartando-se o etanol. O decantado resultante foi seco em estufa a 35 °C por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 4 mL de ácido sulfúrico 0,1 N para solubilizar o resíduo. Os tubos foram transferidos para banho-maria a 80 °C por 40 minutos e após resfriados a temperatura ambiente.

Para determinação da concentração de CMP, pipetou-se 2 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionou-se 0,5 mL do reagente Erlich, mantendo os tubos em banho-maria a 80 °C por 40 minutos, para em seguida resfriar os mesmos até temperatura ambiente. Após realizou-se a leitura em espectrofotômetro modelo DR 2500 (Odyssey-Hatch, Loveland, EUA) a 565 nm.

Para a quantificação do CMP preparou-se uma curva padrão utilizando leite cru recém ordenhado e genuíno, livre de adição de soro e/ou sem proteólise devido ação de psicrotróficos, adicionando-se a esse 30, 60, 90, 120 e 150 mgL⁻¹ de padrão de CMP. Essas soluções foram submetidas às mesmas etapas descritas acima. A partir dessas soluções, construiu-se o gráfico de concentração

de CMP em mg.L⁻¹ versus absorbância a 565 nm. A partir do qual se calculou a regressão linear da curva aceitando-se valores de R próximos de um.

2.4 Análise Estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com vinte e quatro amostras de leite analisadas em triplicata. Os resultados das determinações analíticas de CMP pelos métodos da CLAE e da ninidrina ácida e pelos métodos da CLAE e do reagente Erlich foram avaliados através do teste t (p<0,05), empregando o *software Statistica® for Windows* versão 7.0. Os valores de R foram calculados utilizando o mesmo programa.

3 Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de leite cru refrigerado ao longo do seu período de armazenamento.

Tabela 1 - Resultados (em UFC.mL⁻¹) das análises microbiológicas das amostras do leite cru refrigerado

Amostra	Tempo de Armazenamento (horas)	Contagem Global	Psicrotróficos
A	0	4,0 x 10 ⁴	<1,0 x 10 ⁴
	24	7,6 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵
	48	8,5 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶
B	0	3,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁴
	24	8,4 x 10 ⁵	9,4 x 10 ⁵
	48	2,5 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶
C	0	1,3 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵
	24	4,4 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵
	48	9,8 x 10 ⁵	5,8 x 10 ⁶

Todas as nove amostras foram analisadas em triplicata.

Os resultados das análises de contagem global das amostras de leite cru refrigerado na etapa de recebimento na indústria estão de acordo com os padrões microbiológicos especificados pela legislação brasileira vigente, Instrução Normativa N° 62 (BRASIL, 2011), que é de 7,5 x 10⁵ UFC.mL⁻¹. As amostras A e B com 24 horas de armazenamento e as três amostras de leite cru refrigerado com 48 horas de armazenamento apresentaram contagens acima desse valor. SANTOS (2008) analisou amostras de leite cru

refrigerado coletadas diretamente de 10 tanques de expansão individuais localizados em propriedades leiteiras após zero, 24 e 48 horas de armazenamento e determinou na análise de contagem global resultados médios para as 10 amostras de 5,3 x 10⁶; 9,8 x 10⁵ e 2,5 x 10⁶ UFC.mL⁻¹, respectivamente.

Em relação à contagem de micro-organismos psicrotróficos não existe legislação específica para este parâmetro. Das nove amostras analisadas no presente

trabalho, duas apresentaram contagens de micro-organismos psicotróficos em torno de 10^4 UFC.mL⁻¹, quatro amostras entre 10^5 - 10^6 UFC.mL⁻¹ e três amostras acima de 10^6 UFC.mL⁻¹. Os resultados obtidos são semelhantes aos verificados por CASAROTTI *et al.* (2009), que analisaram 19 amostras de leite quanto à contagem de psicotróficos e verificaram que 94,7 % apresentavam contagens maiores ou iguais a 10^5 UFC.mL⁻¹. As amostras analisadas no presente trabalho apresentaram resultados menores que os verificados por LORENZETTI (2006), que determinou contagens superiores a 10^6 UFC.mL⁻¹ em amostras de leite. No estudo realizado por SANTOS (2008) os resultados médios da contagem de psicotróficos foram de $2,4 \times 10^6$; $6,5 \times 10^5$ e $6,7 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ durante o tempo de armazenamento de zero, 24 e 48 horas, respectivamente, sendo que a contagem do primeiro período de armazenamento foi superior as observadas no presente trabalho.

Os resultados das contagens global e de micro-organismos psicotróficos das amostras de leite cru refrigerado aumentaram ao longo do período de armazenamento de 48 horas. Sendo que todas as amostras de leite com 48 horas apresentaram contagens de psicotróficos superiores a 10^6 UFC.mL⁻¹. Segundo FOX (1989) e CROMIE (1992) a proteólise devido às enzimas proteolíticas produzidas por micro-organismos psicotróficos é significativa quando a contagem é da ordem de $10^6 - 10^7$ UFC.mL⁻¹. Então, se este leite cru resfriado for processado com 48 horas de armazenamento a população de psicotróficos presente no mesmo será suficiente para produzir quantidade significativa de enzimas proteolíticas termorresistentes que poderão comprometer a qualidade do produto e, conseqüentemente, maior concentração de CMP.

A Tabela 2 apresenta os resultados das análises de CMP das amostras de leite cru refrigerado.

Tabela 2 - Resultados das análises de determinação de CMP (em mg.L⁻¹) no leite cru refrigerado pelos três diferentes métodos

Amostra	Tempo de Armazenamento (horas)	CMP CLAE	CMP Espectro - Reativo Erlich	CMP Espectro - Ninidrina ácida
A	0	4	23,10	14,86
	24	6	26,22	16,28
	48	6	26,91	16,59
B	0	6	25,58	15,99
	24	7	29,70	17,86
	48	7	30,01	18,00
C	0	6	28,40	17,27
	24	6	29,96	17,98
	48	6	32,40	19,09

Todas as nove amostras foram analisadas em triplicata.

O método cromatográfico baseia-se na detecção e quantificação de CMP por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com separação em coluna de filtração em gel e detecção em ultravioleta (UV). De acordo com Fukuda (2003), a CLAE é o método aceito internacionalmente para identificar e quantificar CMP. Entretanto, a autora afirma que esse método se torna muitas vezes inviável devido aos altos custos de equipamentos, reagentes e da necessidade de mão de obra altamente especializada.

Além dessa metodologia, de acordo com Magalhães (2008) o CMP pode ser quantificado através da determinação espectrofotométrica, baseada na reação do ácido siálico presente no CMP com p-dimetilaminobenzaldeído ou ninidrina ácida, formando complexos coloridos. Conforme Instrução Normativa Nº 22 (BRASIL, 2003), o ácido siálico é encontrado no

soro de queijo proveniente da coagulação enzimática do leite por estar ligado ao CMP que é liberado da caseína. Desde o desenvolvimento do método de isolamento e dosagem proposto por Warren (1959), a determinação do ácido siálico é estudada para a detecção da fraude de adição de soro de queijo no leite. A sua normatização em 1981 prescreve a determinação espectrofotométrica após a complexação com resorcinol (PEREIRA *et al.*, 2001). Em 1985 o método foi modificado por WOLFCHOON-POMBO e PINTO apud Carvalho *et al.* (2007), substituindo-se o agente complexante resorcinol pelo reagente de Erlich. O método modificado permite detectar adulteração de leite fresco pasteurizado com, no mínimo 2 % de soro de queijo, porém demanda um tempo excessivo de preparo de amostra para análise. Fukuda; Röig; Prata (2004) adaptaram e padronizaram o método de ninidrina ácida para a quantificação

espectrofotométrica a 470 nm do ácido siálico ou N-acetilneuramínico livre ou ligado à glicoproteína de leite fluido e soro de queijo.

A Instrução Normativa N° 69 estabelece os seguintes critérios para a interpretação dos valores referentes ao índice de CMP encontrados nas análises: quando o índice de CMP for de até 30 mg.L⁻¹ o leite poderá ser destinado ao abastecimento direto; quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 e 75 mg.L⁻¹ este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos; quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg.L⁻¹ este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente (BRASIL, 2006b). Tendo em vista esses critérios de classificação do leite e considerando que a proteólise pode acarretar no surgimento de certa quantidade de CMP torna-se extremamente importante o controle do tempo de armazenamento do leite cru refrigerado.

Os resultados de CMP obtidos através da utilização do método CLAE demonstram que o leite cru refrigerado, mesmo após 48 horas de armazenamento, apresenta

uma concentração de CMP de até 7 mg.L⁻¹, estando de acordo com o padrão estabelecido pela legislação que permite que o leite seja destinado ao abastecimento direto, ou seja, todas as amostras de leite cru resfriado estavam aptas para o consumo durante o período avaliado. Resultados semelhantes foram obtidos por Friedrich *et al.* (2010), que verificaram concentrações de CMP inferiores a 12 mg.L⁻¹ mesmo após quatro dias de armazenamento. Almeida *et al.* (2006) analisaram 40 amostras de leite cru coletadas em propriedades do Estado de Goiás, mantidas armazenadas por 24 e 48 horas, e verificaram que 100 % das amostras analisadas quanto à presença de CMP apresentavam resultados negativos, considerando o percentual mínimo de 1,0 %. Comparando os resultados do presente trabalho das contagens de psicotróficos apresentados na Tabela 1 e a variação de CMP ao longo das 48 horas de armazenamento (Tabela 2), verificou-se que as amostras de leite cru refrigerado com maior formação de CMP foram as que apresentaram maiores contagens de micro-organismos psicotróficos.

Os resultados obtidos nas análises de CMP nas amostras de leite UAT estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das análises de determinação de CMP (em mg.L⁻¹) no leite UAT pelos três diferentes métodos

Amostra	Tempo de Armazenamento (meses)	CMP CLAE	CMP Espectro - Reativo Erlich	CMP Espectro - Ninidrina ácida
D	0*	13	39,63	22,37
	1	62	115,64	56,92
	2	84	185,60	82,11
	3	116	226,04	107,10
	4	148	289,04	135,73
E	0*	22	61,50	29,27
	1	96	161,56	77,79
	2	140	341,56	139,60
	3	168	367,60	161,44
	4	208	406,00	188,89
F	0*	18	50,12	25,33
	1	75	110,06	57,99
	2	100	229,92	96,14
	3	128	250,92	118,40
	4	160	295,64	141,54

* Amostras de leite UAT coletadas logo após envase. Todas as quinze amostras foram analisadas em triplicata.

Os resultados obtidos pelo método CLAE indicam que o leite UAT após um mês de armazenamento apresenta uma concentração de CMP superior a 30 mg.L⁻¹,

estando acima do padrão estabelecido pela legislação que permite que o leite seja destinado ao abastecimento direto, ou seja, todas as amostras de leite UAT após 30

dias de armazenamento não estavam aptas para o consumo. Oliveira (2010) ao analisar oito diferentes marcas de leite UAT, utilizando o método CLAE, verificou variação nos resultados de 33,64 a 398,78 mg.L⁻¹. As oito marcas avaliadas apresentaram resultados superiores ao permitido para consumo direto.

Com base nos resultados dos três métodos de determinação empregados, observou-se um gradativo aumento das concentrações de CMP das amostras de leite UAT ao longo dos meses, apesar do leite fresco ter apresentado um baixo índice de CMP e de acordo com a legislação. Essa elevação do teor de CMP ao longo do período de armazenamento também foi verificada por Friedrich *et al.* (2010), que analisaram leite UAT num período de 11 dias de armazenamento e até o quarto dia as amostras apresentaram concentrações de CMP de aproximadamente 45 mg.L⁻¹, aumentando progressivamente após esse período. De acordo com Fukuda (2003), como as proteinases psicrotróficas hidrolisam a caseína na ligação 105-106, levando à formação de CMP, a presença dessa substância em leite UAT não pode ser considerada como indicador de adulteração do leite com soro de queijo.

Magalhães (2008) avaliou o índice de CMP em leite UAT com e sem adição de soro, utilizando o método CLAE. O leite sem adição de soro com 0 e 2 dias de incubação não apresentou presença de CMP ou pseudo-CMP. Já o leite com 4, 6 e 8 dias de incubação apresentou concentração de 638,62; 909,26 e 882,01 mg.L⁻¹ de CMP, não proveniente da adição de soro. A extensa proteólise observada foi suficiente para que o leite apresentasse alteração na sua viscosidade a partir do sexto dia de incubação.

As Figuras 1 e 2 apresentam as correlações dos resultados obtidos de índice de CMP das amostras de leite cru refrigerado e UAT empregando os métodos CLAE e espectrofotométrico com o reagente de Erlich, e CLAE e espectrofotométrico com a ninidrina ácida, respectivamente.

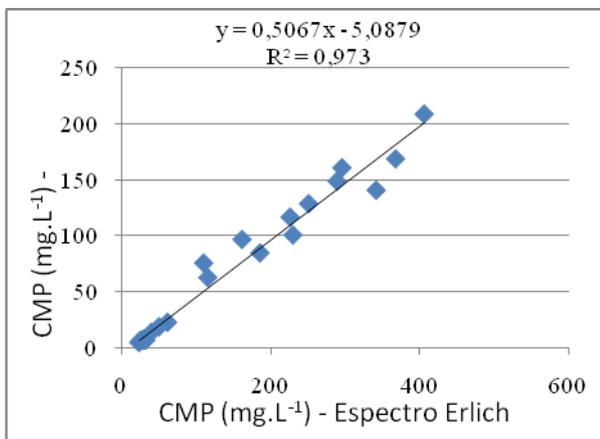


Figura 1 – Correlação dos resultados do índice de CMP das amostras de leite cru refrigerado e UAT pelos métodos CLAE e espectrofotométrico com reagente Erlich.

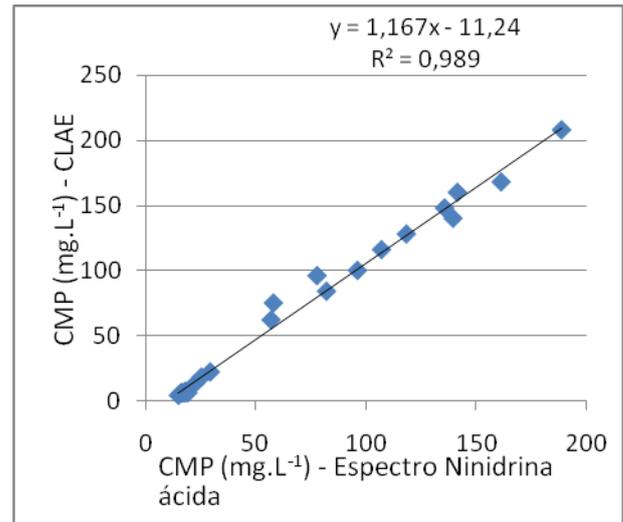


Figura 2 – Correlação dos resultados do índice de CMP das amostras de leite cru refrigerado e UAT pelos métodos CLAE e espectrofotométrico com ninidrina ácida.

Os valores de R² de ambas as equações indicam que há correlação entre os resultados de CMP em amostras de leite obtidos pelos métodos espectrofotométricos e o método de referência de CLAE. Fukuda (2003) realizou sete experimentos utilizando os métodos da ninidrina ácida e CLAE para analisar o teor de ácido siálico em amostras de leite. Todos os experimentos mostraram o aumento do teor de ácido siálico ao longo do período de armazenamento, a partir do dia de produção, demonstrando que há contínua liberação de CMP. Os dados obtidos por ambos os métodos mostraram uma similaridade de comportamento na avaliação do ácido siálico. Ao correlacionar os dados obtidos pela metodologia da ninidrina ácida com os obtidos pela metodologia CLAE o autor determinou um coeficiente de correlação igual a 0,996, que é superior ao verificado no presente trabalho.

Os resultados médios (em mg.L⁻¹) do teor de CMP das 24 amostras analisadas no presente trabalho pelos métodos CLAE, espectrofotométrico com reagente Erlich e espectrofotométrico com ninidrina ácida foram de 66,33; 140,96 e 66,44, respectivamente. Comparando pelo teste t de Student os resultados do método CLAE com o método espectrofotométrico da ninidrina ácida verificou-se que não houve diferença significativa entre eles, porém entre os métodos CLAE e espectrofotométrico com reagente Erlich a diferença foi significativa. Souza (2007) ao realizar a comparação pelo teste t de Student do método espectrofotométrico adaptado de Erlich com o método CLAE também verificou diferença significativa entre eles, sendo o método CLAE mais sensível para a detecção de soro de queijo que o método espectrofotométrico.

4 Conclusão

Nesse estudo observou-se que apesar dos leites cru refrigerado e UAT recém-processado apresentarem baixas concentrações de CMP, o teor desse peptídeo aumenta progressivamente ao longo do tempo de armazenamento, provavelmente em função das proteases de micro-organismos psicrotróficos, indicando que nem sempre uma concentração de CMP acima de 30 mg.L⁻¹ representa que o leite foi adulterado por adição de soro de queijo.

Os três métodos avaliados foram capazes de monitorar a evolução proteolítica no leite. Os métodos espectrofotométricos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,97 com o método cromatográfico estabelecido pela legislação brasileira vigente. Os resultados obtidos indicam que o método espectrofotométrico com ninidrina ácida pode ser utilizado como método alternativo para determinação de CMP em amostras de leite, uma vez que não apresentou diferença significativa quando comparado com o CLAE, além de resultados similares.

5 Referências

ALMEIDA, T. L.; COELHO, K. O.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; SOUZA, C. M.; OLIVEIRA, A. N. **Determinação de caseinomacropéptido em amostras de leite cru refrigerado submetido a diferente tempo de armazenamento.** In: II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Goiânia – GO, 2006. Disponível em: <http://www.terraaviva.com.br/IICBQL/p002.pdf>. Acesso em: 02 dezembro 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes:** Métodos físicos e químicos. v. 2, Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Portaria Nº 124, de 23 de setembro de 1991. Métodos Analíticos Qualitativo e Quantitativo de Detecção de Soro em Leite. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 20 de novembro de 1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro 2011. Regulamento Técnico 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 República Federativa do Brasil]**, Brasília, 30 de dezembro 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 22, de 14 de abril de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 02 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 14 de dezembro de 2006a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui critério de avaliação da qualidade do leite *in natura*, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP”, de que trata a Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 15 de dezembro de 2006b.

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 Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1695-1701, 2007.

CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. Enumeração de bactérias psicrotróficas em leite cru bovino com a utilização da metodologia tradicional e do sistema compact dry®. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 369, n. 64, p. 19-25, 2009.

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

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Epamig/CT/ILCT, 168p., 2003.

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

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

FUKUDA, S. P. **Estudo da Correlação entre o Método da Ninidrina Ácida e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a Dosagem de Glicomacropéptido e Caseinomacropéptido em Leite.** 2003. 137f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

FRIEDRICH, M. T.; FRANKEN, R. B. C.; AZEVEDO, M. S.; PRESTA, M. A.; DALL AGNOL, C. Avaliação da estabilidade do leite *in natura* e UAT quanto ao índice de CMP. **Revista de Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas**, v. 2, n.1, p. 21-27, 2010.

LORENZETTI, D. K. **Influência do tempo e temperatura no desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul.** 2006. 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MAGALHÃES, M. A. **Determinação de Fraude de Leite com Soro de Leite pela Análise de CMP e pseudo-CMP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa com Detecção por Espectrometria de Massa.** 2008. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2008.

OLIVEIRA, R. R. **Aplicação da Espectroscopia de Infravermelho próximo para a Determinação do Caseinomacropéptido em Leite UAT.** 2010. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2010.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-Química do Leite e Derivados.** 2ª. Edição, EPAMIG, Juiz de Fora, p.47, 2001.

SANTOS, P. A. **Avaliação do leite cru refrigerado produzido na região sudoeste do estado de Goiás estocado por diferentes períodos.** 2008. 50f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2008.

SOUZA, C. M. **Validação e comparação de metodologias analíticas empregadas na determinação de CMP em leite.** 2007. 70f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2007.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite.** Santa Maria: Editora UFSM, p. 11-37, 2010.

TULLIO, L. T. **Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite.** 2007, 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WARREN, L. **The thiobarbituric acid assay of sialic acids.** Journal of Biological Chemistry, v. 234, p. 1971-1975, 1959.