

[www.arvoredoleite.org](http://www.arvoredoleite.org)

Esta é uma cópia digital de um documento que foi preservado para inúmeras gerações nas prateleiras da biblioteca Otto Frensel do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), antes de ter sido cuidadosamente digitalizada pela ArvoredoLeite.org como parte de um projeto de parceria entre a ArvoredoLeite.org e a Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes para tornarem seus exemplares online. A Revista do ILCT é uma publicação técnico-científica criada em 1946, originalmente com o nome FELCTIANO. Em setembro de 1958, o seu nome foi alterado para o atual.

Este exemplar sobreviveu e é um dos nossos portais para o passado, o que representa uma riqueza de história, cultura e conhecimento. Marcas e anotações no volume original aparecerão neste arquivo, um lembrete da longa jornada desta REVISTA, desde a sua publicação, permanecendo por um longo tempo na biblioteca, e finalmente chegando até você.

## Diretrizes de uso

A **ArvoredoLeite.org** se orgulha da parceria com a **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** da **EPAMIG** para digitalizar estes materiais e torná-los amplamente acessíveis. No entanto, este trabalho é dispendioso, por isso, a fim de continuar a oferecer este recurso, tomamos medidas para evitar o abuso por partes comerciais.

Também pedimos que você:

- Faça uso não comercial dos arquivos. Projetamos a digitalização para uso por indivíduos e ou instituições e solicitamos que você use estes arquivos para fins profissionais e não comerciais.
  - Mantenha a atribuição **ArvoredoLeite.org** como marca d'água e a identificação do **ILCT/EPAMIG**. Esta atitude é essencial para informar as pessoas sobre este projeto e ajudá-las a encontrar materiais adicionais no site. Não removê-las.
  - Mantenha-o legal. Seja qual for o seu uso, lembre-se que você é responsável por garantir que o que você está fazendo é legal. O fato do documento estar disponível eletronicamente sem restrições, não significa que pode ser usado de qualquer forma e/ou em qualquer lugar. Reiteramos que as penalidades sobre violação de propriedade intelectual podem ser bastante graves.

Sobre a Arvoredoite.org

A missão da **Arvoredoite.org** é organizar as informações técnicas e torná-las acessíveis e úteis. Você pode pesquisar outros assuntos correlatos através da web em <http://arvoredoite.org>.

**REVISTA  
do  
INSTITUTO  
DE  
LATICÍNIOS  
"CÂNDIDO  
TOSTES"**

**Dairy Journal Bimonthly  
Published By THE "Cândido  
Tostes" Dairy Institute**

**Nº 355 JUIZ DE FORA MAR/ABR DE 2007 VOL.62**

**GOVERNO DE MINAS GERAIS  
SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.  
EMPRESA DE PESQUISA ACROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS.  
CENTRO TECNOLÓGICO  
INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES.**



**EPAMIG**

digitalizado por arvoredooleite.org



# Agregando valor à “vida da gente”

“Temos sempre uma solução inovadora para  
oferecer a nossos parceiros.”

Aromas  
Conservantes  
Corantes  
Culturas Láticas  
Emulsificantes  
Especialidades  
Espessantes  
Estabilizantes  
Preparações de Frutas  
Sais Fundentes

A ISP do Brasil/Germinal tem sempre uma solução técnica e criativa para auxiliar a indústria de laticínios. Suas combinações de ingredientes agregam valores funcionais aos produtos, como estrutura, textura, consistência, brilho, cor e sabor. Além disso, propicia economia e funcionalidade no Espessamento, Estabilização e Gelfificação de seus produtos. Para isso, os profissionais de sua equipe técnica estão sempre à disposição para auxiliar no desenvolvimento de diversos produtos lácteos: iogurtes, requeijão, queijos, manteiga, sorvetes, sobremesas, entre outros.

Conte com nosso expertise e obtenha  
Vantagem competitiva no mercado.

**ISP do Brasil Ltda**  
Via das Paineiras, 3.864 - Bairro Pinhal  
Cabeúva - SP CEP 13315-000  
11 4529-8622 - [www.ispcorp.com.br](http://www.ispcorp.com.br)



## REVISTA DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS “CÂNDIDO TOSTES”

### DAIRY JOURNAL BIMONTLHY PUBLISHED BY THE “CÂNDIDO TOSTES” - DAIRY INSTITUTE

#### ÍNDICE - CONTENT

- 1 Análise instrumental de textura e cor do queijo mozzarella de leite de búfala elaborado pelos métodos tradicional e da acidificação direta. Marta Regina Verruma-Bernardi, Maria Helena Damásio, Sonia D. Campos, Vera Lucia P. Ferreira ..... 3
- 2 Análise molecular por meio de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em populações de *Staphylococcus aureus*, causadoras de infecções intramamárias em bovinos. Gonçalves, D., Vicente, V. A., Higuti, I. H., Bittencourt, J.V.M., Neiva, I.F., Pie, M., Andersen, E., Gonçalves, C.H.M. ..... 7
- 3 Bactérias lácticas e mesófilas, lactose, acidez, ph, atividade de água, umidade e cloretos em queijo prato elaborado com leite semidesnatado concentrado. Cichoski, A. J., Steffens, C., Bertoldi, C. ..... 12
- 4 Biodisponibilidade e estabilidade do leite em pó enriquecido com ferro. José Carlos Gomes, Fabrícia Queiroz Mendes, Conceição Angelina dos Santos ..... 21
- 5 Aplicação do modelo de solubilidade ideal a dados experimentais de soluções de lactose em água. Ítalo Tuler Perrone, Fabiana Queiroz Ferrua ..... 33
- 6 Microrganismos psicrotróficos em leite. Elisângela Michele Miguell, Vanessa Aglaê Martins Teodoro, Eduardo Kenji Nunes Ahashiro ..... 38
- 7 Compilação de métodos analíticos para pesquisa de fraudes em leite. Parte I. Danielle Braga Chelini Pereira ..... 44

Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes” - Juiz de Fora - Vol. 62 (355); 1-50 - Mar/Abr de 2007

#### EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS

Centro Tecnológico  
Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”  
Revista Bimestral

Endereço: Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”  
Rua Tenente Freitas, 116 - Santa Terezinha  
36.045-560 - Juiz de Fora - Minas Gerais - Brasil  
Tel.: 3224-3116 - DDD: 32 / Fax: 3224-3113 - DDD 32

**Governo do Estado de Minas Gerais**  
Aécio Neves da Cunha

**Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gerais**  
Gilman Viana Rodrigues

**Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**

Baldonedo Arthur Napoleão - Presidente  
Luiz Carlos Gomes Guerra - Diretor de Administração e Finanças  
Enilson Abrahão - Diretor de Operações Técnicas

**Centro Tecnológico - Instituto de Laticínios Cândido Tostes**

**Comitê Gerencial**

Gerson Occhi - Chefe do CT/ILCT

Fernando Antônio Resplande Magalhães - Ger. Est. do Prog. de Pesquisa Processamento Agroindustrial  
Adauto de Matos Lemos - Coordenador de Prospecção de Demandas  
Danielle Braga Chelini Pereira - Coord. do Programa Ensino Leite e Derivados  
José Lourenço Pereira Russi - Supervisor do Núcleo de Administração e Finanças  
Luiza Carvalhaes Albuquerque - Coordenadora de Transferência e Difusão de Tecnologia  
Nelson Tenchini Macedo - Supervisor do Núcleo de Indústria e Comércio  
Paulo Henrique Fonseca da Silva - Coordenador de Pesquisa

**Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**

Luiza Carvalhaes Albuquerque  
Especialista em Marketing e Qualidade Total

**Jornalista Responsável**

Ana Cristina Oliveira Ajub  
Reg. Prof. MTB. 4410

**Corpo Revisor da Revista do ILCT**

Adauto de Matos Lemos  
Antonio Fernandes de Carvalho  
Ariene Gimenes Fernandes Van Dender  
Célia Lucia Luces Fortes Ferreira  
Celso José de Moura  
Daise Aparecida Rossi  
Danielle Braga Chelini Pereira  
Edna Froeder Arcuri

Fernando Antônio Resplande Magalhães  
Ítalo Tuler Perroni  
Luiz Carlos Gonçalves Costa Júnior  
Luiza Carvalhaes de Albuquerque  
Luiz Ronaldo de Abreu  
Miriam Aparecida Oliveira Pinto  
Nélio José de Andrade  
Paulo Henrique Fonseca da Silva

*Os trabalhos apresentados são de inteira responsabilidade de seus autores.*

Juiz de Fora, abril de 2007

**EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS**  
- EPAMIG -

Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", n. 1 - 1946 - Juiz de Fora. Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", 1946.

v. ilust. 23 cm

n. 1-19 (1946-48), 27 cm, com nome de Felctiano, n. 20-73 (1948-57), 23 cm, com o nome de Felctiano.

A partir de setembro de 1958, com o nome de Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes".

1. Zootecnia - Brasil - Periódicos.
2. Laticínios - Brasil - Periódicos
1. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Juiz de Fora, MG, ed.

ISSN 0100-3674

CDU 636/637(81)(50)

**ANÁLISE INSTRUMENTAL DE TEXTURA E COR DO QUEIJO MOZZARELLA DE LEITE DE BÚFALA ELABORADO PELOS MÉTODOS TRADICIONAL E DA ACIDIFICAÇÃO DIRETA**

Marta Regina Verruma-Bernardi\*  
Maria Helena Damásio\*\*  
Sonia D. Campos\*\*\*  
Vera Lucia P. Ferreira\*\*\*

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características de textura e cor por meio instrumental do queijo Mozzarella elaborado pelos métodos tradicional e da acidificação direta com a adição de ácido cítrico. As medições da cor foram feitas por reflexão de luz utilizando um espectrofotômetro. O queijo elaborado pelo método de acidificação direta apresentou menores valores de luminosidade e maiores valores de cor verde em relação ao tradicional. A análise da textura foi feita utilizando um texturômetro e mostrou que o queijo elaborado pela acidificação direta foi mais macio, com uma redução de 48% no valor da força máxima de compressão.

**Palavras-chave:** queijo Mozzarella, leite de búfala, cor, textura.

**1. INTRODUÇÃO**

O processo comumente utilizado para a elaboração do queijo Mozzarella propicia, através da fermentação da massa, a redução do pH e a sinerese da coalhada. Estas transformações favorecem o processo de filagem e o desenvolvimento das características sensoriais do queijo.

Uma alternativa ao método tradicional para elaboração do queijo Mozzarella é a técnica da acidificação direta. Este método tem sido utilizado na elaboração de vários tipos de queijos, pois substitui de forma total ou parcial a acidificação proveniente da atividade microbiana através da adição dos ácidos. A acidificação direta do leite para elaboração de queijos diminui a quantidade de coalho a ser utilizada, o tempo de coagulação e consequentemente leva a redução do tempo de fabricação (Little 1967; Quarne *et al.* 1968; Olson 1971; Sordi 1988; Valle, 1991; Sampaio *et al.*, 1996; Verruma-Bernardi, 2000).

Trabalhos realizados por Coppola *et al.* (1990), revelaram controvérsias sobre a qualidade final do produto. Segundo estes autores, o queijo Mozzarella de leite de búfala, elaborado pela técnica de acidificação direta com ácido cítrico, tem suas características sensoriais modificadas.

Estudos realizados com queijo Mozzarella elaborado pela acidificação direta em comparação com a tradicional confirmaram as diferenças entre os processamentos. Verruma-Bernardi *et al.* (2000) verificaram que o queijo elaborado pela acidificação direta tinha maior umidade. O queijo Mozzarella tradicional apresentou maiores níveis de proteína, sólidos totais, porém, não apresentou diferenças para os níveis de gordura, cinzas e cálcio e na aceitação entre as amostras.

Este trabalho teve como objetivos estudar as características de textura e cor por meio instrumental do queijo Mozzarella elaborado pelos métodos tradicional e da acidificação direta.

**2. MATERIAL E MÉTODOS**

**- Elaboração dos queijos**

Foram utilizadas amostras de queijo Mozzarella elaborado com leite de búfala pelo método tradicional e pelo método de acidificação direta com a adição de ácido cítrico. A metodologia de elaboração dos queijos está descrito em Verruma-Bernardi *et al.* (2000).

**- Avaliação instrumental de textura**

A textura dos queijos foi avaliada pela força máxima de compressão utilizando o texturômetro

\* Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural/UFSCar . Via Anhanguera, km 174 - Caixa Postal 153, 13600-970 - Araras-SP. verruma@cca.ufscar.br

\*\* Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos - CSIC - València - Espanha.

\*\*\* Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL - Campinas - SP.

TA.XT2 Texture Analyser. Utilizou-se amostras cilíndricas com 1,5cm de diâmetro e em seguida cortadas em cilindro de 1,5cm de altura. Foi utilizada uma célula de compressão com velocidade de 0,8mm/s e uma distância de compressão da amostra de 11,3mm, sendo medido o parâmetro de força máxima de compressão (Thorborrow & Mitchell, s.d.).

#### - Avaliação instrumental de cor

As medições da cor foram feitas por reflexão de luz utilizando um espectrofotômetro CONCOR 1500 Plus sob o iluminante C, ângulo de 20° e configuração DREOL, correspondente ao intervalo de comprimento de onda de 360nm a 740nm (Ferreira, 1981). Foram traçadas as curvas de reflectância das duas amostras.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da força máxima de compressão para o queijo obtido pela acidificação direta e pelo tradicional de 20.000g e 11.000g respectivamente mostraram, que o queijo Mozzarella elaborado pelo método de acidificação direta apresentou-se mais macio, com uma redução de 48% no valor da força máxima. Também apresentou-se mais elástico que o tradicional, uma vez que o produto deformou mais ao ser comprimido, como pode ser observado na Figura 1.

Segundo Keller et al. (1974), a composição e as características de textura como firmeza e elasticidade do queijo Mozzarella são influenciadas por inúmeras variáveis, sendo que a produção de ácidos pelos microrganismos é uma das mais importantes. A acidificação direta pode eliminar a variabilidade da produção de ácidos pelas bactérias e o pH do queijo permanece constante durante a sinesse do soro, permitindo que as características sensoriais e de composição dos queijos por acidificação direta podem ser controladas.

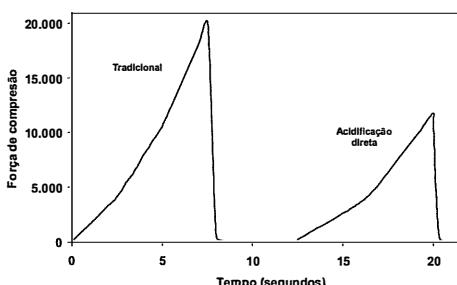
De acordo com Demott (1983) e Valle (1991), a adição de ácidos deve ser feita de forma rápida e homogênea, para que não ocorra a flocação ocasionando desta forma problemas na qualidade final do produto bem como perdas no rendimento.

#### - Análise instrumental da cor

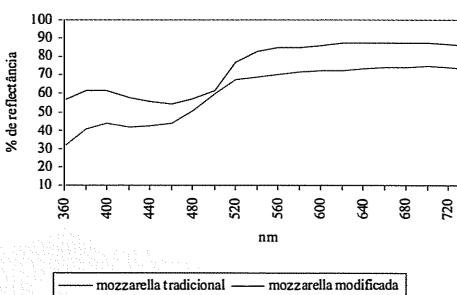
A Tabela 1 mostra que o queijo Mozzarella

obtido pela acidificação direta em relação ao método tradicional, apresentou menor valor de luminosidade (L Hunter) ou seja, foi mais escura, apresentou também maiores valores de verde (-a Hunter) e valores similares de amarelo (b Hunter). Van Dender (1989), relata que a presença do pigmento biliverdina associado à  $\alpha$ -caseína do leite, que precipita juntamente com as proteínas, pela ação de ácido e calor, produzi um precipitado esverdeado. Tal pigmento é reduzido de forma reversível à bilirrubina, de cor amarela, durante a estocagem.

A Figura 2 mostra as curvas espectrais com valores de porcentagem de reflectância maiores na amostra tradicional com um ponto bastante próximo ao do queijo obtido pela acidificação direta a 500nm.



**Figura 1** - Resultados da análise instrumental dos queijos elaborado pelo método tradicional e pela acidificação direta.



**Figura 2** - Curvas de valores de porcentagem de reflectância dos queijos.

**Tabela 1** - Resultados obtidos para as medições de cor do queijo Mozzarella.

Medidas	Métodos	
	Tradicional	Acidificação Direta
Luminosidade - L Hunter	89,61	82,85
Verde - a Hunter	-2,14	-4,84
Amarelo - b Hunter	18,94	19,57

### 4. CONCLUSÕES

- As medidas instrumentais de textura indicaram que o queijo elaborado pelo método de acidificação direta apresentou-se mais macio, com uma redução de 48% no valor da força máxima de compressão.
- De acordo com os resultados da análise instrumental de cor, o queijo Mozzarella elaborado pela acidificação direta, apresentou menores valores de luminosidade e maiores valores de verde.

### ABSTRACT

The main objective of this work was compare the characteristics of texture and color evaluated by instrumental methods of the Mozzarella cheese made from buffalo milk by the traditional and direct acidification with citric acid methods. Color analysis were carried out by light reflection, using a spectrophotometer. The Mozzarella cheese obtained by direct acidification presented a lower luminosity value and higher green color values in relation to the traditional. The texture analysis was made with a texturometer and showed that the cheese elaborated by the direct acidification method was softer, with a 48% reduction in the maximum force value.

**Key words:** Mozzarella cheese, buffalo milk, texture, color.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COPPOLA, S.; VILLANI, F.; COPPOLA, R.; PARENTE, E. Comparison of different start systems for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Le Lait*, Paris, v.70, n.5/6, p.411-423, 1990.
- DEMOTT, B.J. Recovery of milk constituents in a Mozzarella-Like product manufactured from nonfat dry milk and cream by direct acidification at 4°C and 35°C. *Journal of Dairy Science*, 1983, v.66, n.12, p.2501-2506, 1983.
- FERREIRA, V.L.P. Princípios e aplicações da colorimetria em alimentos. Campinas, ITAL, 1981. 85p. (ITAL. Instruções Técnicas, 19).
- LITTLE, L. Techniques for acidified dairy products. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.50, n.10, p.1589-1591, 1967.
- OLSON, N.F. Continuous direct acidification system for producing Mozzarella cheese. *Food Trade Review*, New York, v.41, n.10, p.28-31, 1971.
- SAMPAIO, L.G.A.; FERRAZ, M.A.; FIALHO, M.S.; BRANDÃO, S.C.C. Mussarela. *Indústria de Laticínios*, São Paulo, v.1, n.5, p.46-49, 1996.
- SORDI, S. Mozzarella production by acidification. *Dairy Industry International*, London, v.53, n.5, p.33, 1988.
- THORNBORROW, C.T.; MITCHELL, J.R. The application of the TA.XT2: texture analyses for measuring texture of various foodstuffs. s.d. 27p.
- VALLE, J.L.E. Influência de parâmetros físicos-químicos na fermentação e filagem do queijo Mozzarella. São Paulo, 1991. 88p. Tese de Doutorado Ciências dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, Universidade de São Paulo.
- VAN DENDER, A. G. F. Utilização artesanal de leite de búfala. Campinas: ITAL, 1989. 60p. (ITAL. Manual técnico, 3).
- VERRUMA-BERNARDI, M.R.; DAMÁSIO, M.H.; VALLE, J.L.E. OLIVEIRA, A.J. Elaboração do queijo Mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.20, n.2, p.138-144, 2000.



# ESPECIALISTA EM CULTURAS LÁCTEAS

**“LYOFAST”**

Sacco Brasil, Rua Uruguaiana, 1379, Bosque, 13026-002 Campinas SP  
 Tel/Fax: 19-3253-5333 E-mail: [saccobrasil@saccobrasil.com.br](mailto:saccobrasil@saccobrasil.com.br)  
[www.saccosrl.it](http://www.saccosrl.it) [www.clerici.org](http://www.clerici.org)

## ANÁLISE MOLECULAR POR MEIO DE RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) EM POPULAÇÕES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, CAUSADORAS DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS EM BOVINOS

Gonçalves, D.<sup>1</sup>  
 Vicente, V. A.<sup>2</sup>  
 Higuti, I. H.<sup>2</sup>  
 Bittencourt, J. V.M<sup>3</sup>  
 Neiva, I. F<sup>4</sup>  
 Pie, M<sup>4</sup>  
 Andersen, E.<sup>5</sup>  
 Gonçalves, C.H.M.<sup>5</sup>

### RESUMO

Amostras isoladas de *Staphylococcus aureus* ( $n = 75$ ) de mastite bovina, foram caracterizadas por meio de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Os isolados eram coletados de 75 quartos em lactação, durante a fase aguda da infecção com objetivo de verificar a variabilidade genética das amostras. Para extração de DNA usou-se Brometo de cetiltrimetilâmônio (CTAB), e o DNA extraído foi purificado por clorofórmio e álcool isoamílico, e conservado em TRIS-EDTA (TE). Para o estudo da variabilidade genética foram utilizados os isolados, duas linhagens referência, um *Streptococcus sp.* como grupo externo, e um total de seis primers até a conclusão dos trabalhos. Os resultados demonstraram 108 marcadores revelando significante variabilidade entre as linhagens estudadas considerando-se sua procedência e os dados clínicos, em diferentes populações animais.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; polimorfismo genético; RAPD; mastite bovina.

### INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma das causas de mastite bovina, com importância econômica (MYLLS *et al*, 1997). Segundo CULLOR (1992), esta doença ataca em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50%, dados confirmados por GONÇALVES e KOZICKI (1997). Muitos métodos bioquímicos e moleculares têm sido usados nas investigações da bactéria em infecções humanas e bovinas (HARTSTEIN *et al*, 1989; WILLIAMS *et al*, 1990, PREVOST *et al*, 1991, KOSTEMAN *et al*, 1992 e KAPUR *et al*, 1995).

Na presente pesquisa usou-se o método de RAPD, que permitiu estudar o polimorfismo genético dessa importante bactéria, investigando sua diversidade e dispersão geográfica.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Isolamento das bactérias

Um total de 217 amostras de *S. aureus*, provenientes de 10 populações de bovinos leiteiros distribuídas geograficamente, foram caracterizadas por meios de testes morfológicos e bioquímicos. Inoculadas em Agar sangue de carneiro, KONEMAN,(2001), verificou-se o grau de hemólise, e a coloração de Gram. Amostras de *S. aureus* β-hemolíticos foram repicadas em Agar Chapman e transferidas para meios líquidos: manitol, caldo simples e Clark Lubis, realizando-se as provas de coagulase em tubo, e Voges-Proskauer (VP). As amostras coagulase positivas, manitol e V.P. positivas, foram mantidas a 4-8 °C, em Agar manitol salgado inclinado, ( $n=75$ ).

- 1 Doutorando em Processos Biotecnológico e Professor da PUC-PR;
- 2 Professores do Departamento de Patologia Básica-UFPB;
- 3 Eng. Agrônoma do Laboratório de Melhoramento Florestal - UFPR;
- 4 Departamento de Zoologia – UFPR;
- 5 Bolsistas da PUC-PR.

### Extração de DNA

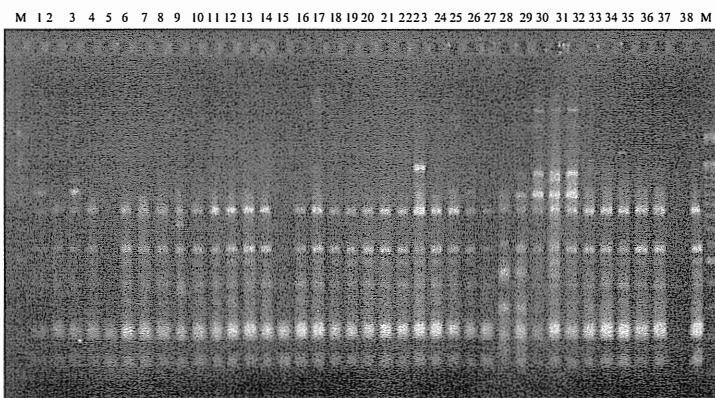
Isolados destas colônias foram transferidas para caldo *BHI* (infusão de coração-cérebro), a 37°C por 45 horas, de onde um volume de 6 mL, com aproximadamente  $10^8$  células foi centrifugado, e o *pellet* lavado com TRIS-EDTA (TE). O composto CTAB foi usado para extraer o DNA total, (DELLAPORTA *et al.*, 1983; DOYLE e DOYLE, 1987; MULLY *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002). Os *pellets* de DNA, cuja integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, foram armazenados em TE, a temperatura de -20°C.

### Análise molecular - RAPD

Utilizaram-se os *primers*: OPJ 5 (5'CTCCATGGGG 3'); OPJ 6 (5' TCGTTCCGCA 3'); Primer 786 (5' GCGATCCCCA 3'); Primer 797 (5' AGCGTCACTG 3') e Primer 798 (5' TGACCCGCC 3'), baseado em trabalhos de MULLY *et al.*, (1997) e PEREIRA *et al.*, (2002) e OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3').

As reações com volume de 14,9  $\mu\text{L}$ , contendo: 20ng de DNA purificado e 1,0 de *Taq* DNA polimerase, 3 mM 1<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 50 mM 1<sup>-1</sup> KCl, 10 mM 1<sup>-1</sup> Tris-Cl (pH 8,8), 200  $\mu\text{M}$  de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,5 mM de primer, foram realizadas segundo PEREIRA *et al.*, (2002) e submetidas a 45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 36°C e 1 min 30 s a 72°C, com 3 min de desnaturação inicial a 94 °C e 5 min de extensão final a 72°C.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, 1,6%, em TRIS -Borato-EDTA buffer, a voltagem de 114 mV. O tamanho dos fragmentos de DNA foi determinado por marcador molecular de 100 pb. Incluiu-se em todas amplificações, controle negativo de duas linhagens referência e um grupo externo.



**Figura 1** - Padrão de amplificação das amostras de DNA de *S. aureus*, mostrando as amostras de número 1 a 38 e marcadores de 100 pb.

### Análise do polimorfismo

A análise do polimorfismo realizada por RAPD foi verificada fenéticamente com o método de "Agrupamento" (UPGMA - Unweighted pair group method with arithmetic mean), (MEYER, 1995), utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa NTSYS, versão 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), (Rohlf, 2000).

A consistência dos agrupamentos foi verificada pelo *bootstrap* (FELSENSTEIN 1986 e 1993), utilizando o Software Winboot-Filipinas.

No método UPGMA, o suporte de *bootstrap* foi obtido com 10.000 amostragens com reposição dos dados dos marcadores. Apenas os agrupamentos que apresentaram valores de *bootstrap* maior ou igual a 70% foram considerados consistentes.

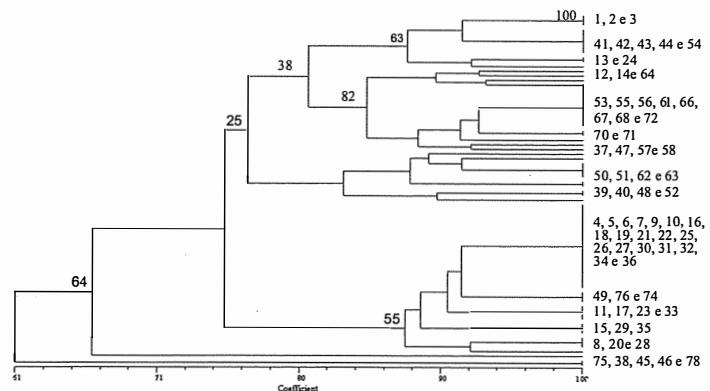
Para testar a significância dos grupos formados no método de "Agrupamento" foi realizada AMOVA utilizando o programa dyerlab.bio.vcu.edu - USA.

### RESULTADOS

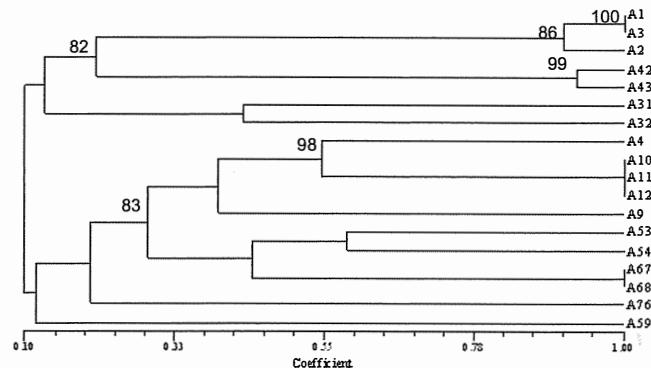
#### RAPD

Os seis *primers* utilizados geraram 108 bandas determinadas visualmente, e ao considerar os dados clínicos, verificou-se que duas bandas monomórficas, correspondiam a casos clínicos e subclínicos.

O dendrograma obtido por UPGMA (figura 2), ratificou esses grupos, por apresentarem baixa similaridade em relação aos demais, além do utilizado como grupo externo. No entanto, a maioria dos agrupamentos teve um baixo valor de *bootstrap* sugerindo que, provavelmente, existissem isolados genéticamente intermediários aos grupos.



**Figura 2** - Dendrograma mostrando a formação de árvore com dois grupos de *S. aureus*, disseminados em 10 populações de bovinos leiteiros, ressaltando a alta similaridade entre alguns deles, porém com *bootstrap* muito baixos, ( $n = 78$ ).



**Figura 3** - Dendrograma mostrando a formação de árvore com dois grupos de *S. aureus*, disseminados em 10 populações de bovinos leiteiros, ressaltando a baixa similaridade entre amostras de casos subclínicos e de fase aguda, porém com *bootstrap* muito altos, e significância de  $p < 0,001$  ( $n = 18$ ),

Dessa forma, obteve-se um novo dendrograma, com as amostras 1,2,3,4,9,10,11,12, 31,32,42,43,53,54,55,67,68 e 76, (HILLIS e BULL, 1993; SITNIKOVA *et al.*, 1995), sem os demais isolados. Com a exclusão desses, do grupo externo e de uma das linhagens referência, os demais isolados se reuniram em dois grupos com valores de *bootstrap* mais consistentes (figura 3), que foram sustentados utilizando o método da AMOVA, ( $p < 0,001$ ).

### DISCUSSÃO

Neste trabalho a técnica de RAPD foi usada para investigar o polimorfismo genético de 75 amostras de *S. aureus*, proveniente de mastite bovina.

A análise com marcadores RAPD utilizando o algoritmo UPGMA, (SNEATH e SOKAL, 1973; NEI e TAKEZAKI, 1994; POLLOCK e GOLDENSTEIN, 1995), a análise *bootstrap* e o teste de significância AMOVA, (FELSENSTEIN 1986 e 1993), sugerem a distinção entre dois grupos formados, pois a variância observada entre eles, foi ( $p < 0,001$ ). Observou-se grupos associados fortemente aos quadros subclínicos e de fase aguda da doença, e a idade do animal. Verificou-se nessa análise, associações entre isolados originários da mesma população, subgrupos estes com similaridade de 100% (figura 2).

As análises de isolados com maior confiança, sustentou essa associação, visto que os subgrupos com altos valores de confiabilidade (*bootstrap*) (figura 3), agruparam indivíduos originários dos

mesmos rebanhos, apesar de não formarem grupos distintos, em congruência com o UPGMA, (SANDERSON e WOJCIECHOWSKI, 2000),

Tais resultados concordaram com a literatura, (HARTSTEIN *et al*, 1989; WILLIAMS *et al*, 1990; PREVOST *et al*, 1991; KOSTEMAN *et al*, 1992); KAPUR *et al*, 1995, PEREIRA E SIQUEIRA JÚNIOR, 1995 e PEREIRA *et al*, 2002), a qual sugere que micro-habitats podem agir como fonte de infecção para animais de populações locais e que existe uma relação regional entre os diversos isolados relacionados geneticamente.

A grande variabilidade genética encontrada entre os isolados estudados, sugere uma associação entre genótipo e os rebanhos e forma de apresentação da doença. As análise realizadas, reforçam os dados obtidos por UPGMA (figura 2 e 3), pois sugeriu que as linhagens 1,2,3,42 e 43 eram muito diferentes das demais, agrupando-se, à parte.

Portanto, a RAPD, constitui-se em valiosa técnica, aliada aos estudos de significância dos seus dados, para traçar a origem de infecções estafilocócicas do úbere bovino, e estudar-se sua epidemiologia molecular.

O presente trabalho sugere a realização de estudos futuros para comparar essa variabilidade genética à resistência das linhagens, ao contrário do relatado por PEREIRA E SIQUEIRA JÚNIOR, (1995).

#### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* isolates, from bovine mastitis ( $n = 75$ ) and characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD). The isolates were collected from 75 quarters in lactation during the acute phase of infection. The aim of these studies was compare the *S. aureus* isolates genetic polymorphism. The genetic material amplified was extract from coccus by cetiltrimetil ammonium bromide, purified by chloroform and isoamilic alcohol and preserved with Tris-EDTA (TE). We use two reference strains, one out group and a total of six primers till de conclusions of the work. The results demonstrate significant heterogeneity of de strains studied about the precedence and epidemiology by the molecular systematic methods and the large dissemination of some clones in different animal populations. In the other hand the molecular methods used was effective to contribute with futures studies monitoring the microorganism.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CULLOR, J.S. Mastitis in dairy cows. Does it hinder reproductive performance? Vet. Med.

Lenexa, n.8, p. 830-835, 1992. Spacer pcr., J.Clin. Microbiol., v. 39, n. 9, p. 3099-103, 2001.

DELLAPORTA, S. L; WOOD, J; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: versión II. Plant Molecular Biology Reporter, v. 1, p. 19-21, 1983.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, v. 19, p. 11-15, 1987.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using Bootstrap. Evolution, n. 39, p. 783-791, 1985.

GONÇALVES, D; KOZICKI, L. E. Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci. São Paulo, v. 34, n.6, p.371-382, 1997.

HARTSTEIN, A.I; MORTHLAND, V.H; ENGS *et al*. Restriction enzymes analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *S. aureus* blood culture isolates. Journal of Clinical Microbiology, n. 27,p.1874-1879, 1989.

HILLIS, D.M e BULL, J.J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Syst. Biol., n. 42, p. 17-48, 1993.

KAPUR, V; SISCHO, W.M; GREEN, R.S *et al*. Molecular population genetic Analyses of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Journal of Clinical Microbiology, n. 33, p.376-380, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; EINN, W.C. Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Lippincott Company, philadelphia, p. 539-576, 2001.

KOSTEMAN, J.R; EDLING, T.D; LIPUMA, J.J; STULL, T.L. Molecular Epidemiology of *pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain Reaction ribotyping. Journal of clinical microbiology, n. 30, p. 2004-2087, 1992.

MEYER, D. Árvores evolutivas humanas: Uma discussão sobre inferência filogenética. Série Monografias, n.3, 1993.

MYLLYS, V. *et al* , Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. Veterinary Microbiology, n. 51, p. 245-251, 1997.

NEI, M; TAKEZAKI, N; SITNIKOVA, T. Assessing molecular phylogenies. Science, n. 267, p. 253-255, 1995.

PEREIRA, M.S.V. *et al* , Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD And ribotyping-PCR. Letters in Applied Microbiology, n. 35, p. 32-36, 2002.

PEREIRA , M.S.V. e SIQUEIRA JR. Antimicrobial drug resistance in *S. aureus* Isolated from cattle in Brazil. Letters in Applied Microbiology, n. 20, p. 391-395, 1995.

POLLOCK, D.D; GOLDSTEIN, D.B. A comparison of two methods for Constructing evolutionary distances from a weighted contribution of transition And transversion differences. Mol. Biol. Evol., n. 12, p. 713-717, 1995

PREVOST, G; POTTECHER,B; DALHET, M. *et al*. Pulsed-field gel Electrophoresis as a new epidemiological tool for monitoring methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a intensive

care unit. Journal of Hospital Infections, n. 17, p. 255-259, 1991

ROHLF, FJ. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system – Version 2.1. New York, Applied Biostatistic Inc., 44 p, 2000

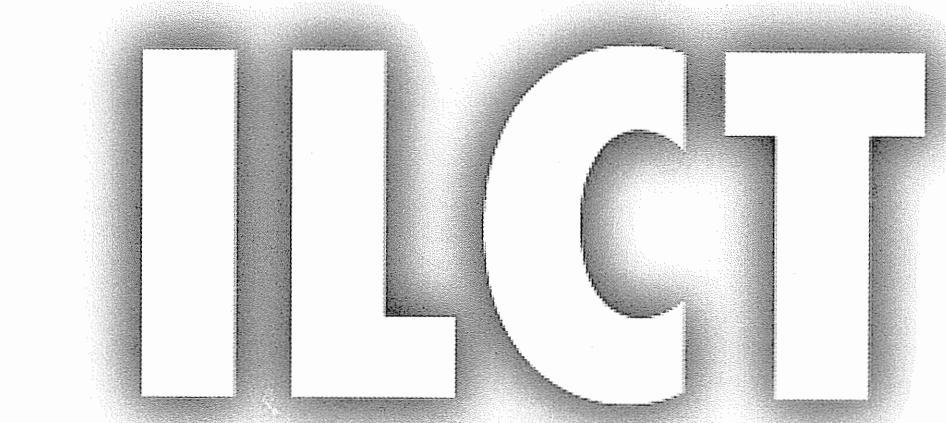
SANDERSON, M.J; WOJCIECHOWSKI, M.F. Improved bootstrap confidence Limits in large scale phylogenies, with an example from neoastragalus (Leguminosae), Sist. Biol. N. 49, p. 671-685, 2000.

SITNIKOVA, T; RHZETSKI, A; NEI,M. Interior-branch and bootstrap tests of phylogenetic trees. Mol. Bio.evol. n. 12, p.319-333, 1995.

SNEAT, P.H.A e SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy, W.F. Freeman, San Francisco, USA, 1973.

WILLIAMS, J.G.K;KUBELIK, A.R; LIVAK, K.J, *et al*. DNA polymorphisms amplified by binary primers are useful as gene tic markers. Nucleic Acids research, n. 18, p. 6531-6535, 1990.

## ASSINE A REVISTA DO



## BACTÉRIAS LÁCTICAS E MESÓFILAS, LACTOSE, ACIDEZ, PH, ATIVIDADE DE ÁGUA, UMIDADE E CLORETOES EM QUEIJO PRATO ELABORADO COM LEITE SEMIDESNATADO CONCENTRADO

Cichoski, A. J.<sup>1</sup>  
Steffens, C.<sup>1</sup>  
Bertoldi, C.<sup>1</sup>

### RESUMO

Leite com 1,3% de gordura foi concentrado durante 20 minutos a temperatura de 50°C, em rotação de 170 rpm e pressão de vácuo de -0,85 bar. Após elaborou-se queijo Prato e acompanhou-se o comportamento das bactérias lácticas e heterotróficas aeróbias mesófilas, os valores de lactose, acidez, pH,  $a_w$ , umidade e cloretoes durante os 60 dias de armazenamento a 15°C e umidade relativa entre 80% a 85%. As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas logo depois de elaborado o queijo e no 7°, 15°, 30°, 45° e 60° dia de armazenamento. O queijo elaborado com leite concentrado (teste), apresentou valores superiores de lactose e acidez, quando comparados com os valores do queijo elaborado com leite sem concentrar (padrão). As contagens das bactérias lácticas e heterotróficas aeróbias mesófilas encontradas durante o período de armazenamento no queijo teste, foram menores do que as encontradas no queijo padrão. A cultura pura adicionada no queijo teste cresceu bem, mesmo em baixos valores de umidade e  $a_w$ .

**Palavras-chave:** acidez, bactérias lácticas, lactose, queijo Prato, leite concentrado.

### 1 - INTRODUÇÃO

O queijo Prato caracteriza-se por ser tipicamente brasileiro, classificando-se como queijo gordo e de umidade intermediária (42% a 45%), apresentando características químicas e textura similar ao queijo Gouda (Anvisa, 1996; Katsuda *et al.*, 1999).

Queijos elaborados com leite parcialmente desengordurado, apresentam menor rendimento, textura mais firme, problemas de acidez e acentuado sabor amargo. Uma das alternativas para aumentar o rendimento dos queijos produzidos a partir do leite desnatado é a pré-concentração a teores de sólidos totais mais elevados. Essa metodologia apresenta um aumento do rendimento na ordem de 8% a 20% (Cunha *et al.*, 2002).

A retirada de água do leite através da concentração a vácuo, é realizada em temperaturas baixas, obtendo-se produtos com maior rendimento, qualidade e vida útil (Blais & Boulet, 1991), apresentando interesse tecnológico e econômico (Labuza *et al.*, 1976).

Leite semidesnatado foi submetido à concentração em dispositivo de ultrafiltração e evaporação em escala de laboratório. Observou-se que a con-

centração por evaporação foi vantajosa pelo fato de necessitar menor tempo de concentração, facilidade de limpeza e simplicidade de processo. Com os concentrados confeccionou-se queijo Prato e obteve-se um acréscimo no rendimento de 19% para leite concentrado por ultrafiltração e 21,7% ao concentrado por evaporação, em termos de massa de queijo comparado com queijo produzido convencionalmente (Steffens *et al.*, 2005a; Steffens *et al.*, 2005b).

O pH controla no queijo o tipo de fermentação e as atividades das enzimas, diminui o seu valor durante o período de maturação, e como consequência aumenta a atividade das enzimas proteases bacterianas e as naturais do leite (Grappin *et al.*, 1985). A velocidade de formação e a quantidade de ácido láctico produzido influenciam na qualidade do queijo, na regulação do pH e no equilíbrio iônico, exercendo ação de inibição no desenvolvimento das bactérias patogênicas potenciais (Saboya *et al.*, 1998).

Queijo semiduro, que no processamento a massa é lavada, atinge durante a maturação pH entre 5,2 e 5,3, o que é bastante apropriado para o processo de formação de olhaduras, em decorrência do desenvolvimento das culturas lácticas adicionadas (Furtado, 2002).

A atividade de água ( $a_w$ ) é um fator importante na conservação dos queijos, sendo seu valor influenciado pelos teores de umidade e sal. Durante o período de armazenamento do queijo, ocorrem várias alterações nos valores de  $a_w$ , e a região central é a que apresenta o maior valor. Esse valor é decorrente de uma série de fenômenos físicos complexos (drenagem, evaporação da água, difusão do sal), fenômenos químicos (interações entre o substrato e cloreto de sódio) e fenômenos bioquímicos (proteólise, lipólise e glicolise) (Sarantopoulos *et al.*, 2001).

No queijo a ação das enzimas endopeptidases e exopeptidases, produzidas pelas culturas lácticas, liberam os aminoácidos e os peptídeos, que contribuem para o aumento da fração protéica solúvel, fenômeno conhecido como proteólise secundária (Grappin *et al.*, 1985). A participação desta fração solúvel no desenvolvimento do "flavor" é conhecida, acreditando-se que ela seja o precursor do "flavor" e também responsável pelo desenvolvimento do sabor amargo (Mc. Gugan & Larmond, 1977).

Uma grande variedade de microrganismos estão envolvidos na maturação dos queijos, onde a contagem total geralmente excede a  $10^8$  UFC/g. Os principais grupos de bactérias presentes no processo de maturação são os *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Propionibacterium*, (Sbampato *et al.*, 1998), crescendo a maioria entre 20°C e 25°C (Perry, 2004).

Grande parte das bactérias patogênicas cresce em  $a_w$  maior que 0,91 demonstrando assim sua função seletiva. A umidade relativa dentro da câmara de maturação é importante para não favorecer os microrganismos indesejáveis e desfavorecer microrganismos desejáveis. Umidades relativas entre 90% e 95% favorecem a maturação do queijo pela microbiota superficial, enquanto que umidades relativas entre 80% e 85% favorecem a maturação interna (Ferreira, 2004).

Tendo em vista que a maioria dos trabalhos que tratam de queijo elaborado com leite concentrado relatam somente a vantagem do aumento no rendimento e sua composição centesimal, esse trabalho teve como objetivo acompanhar o comportamento das bactérias lácticas e heterotrófica mesófilas aeróbias, e os valores de lactose, acidez, pH,  $a_w$ , umidade e cloretoes, em queijo Prato, elaborado com leite semidesnatado concentrado, armazenado durante 60 dias a 15°C.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1 - Materiais

##### 2.1.1 - Matéria-prima e evaporador

Utilizou-se leite pasteurizado com 1,3% de

gordura, o qual foi concentrado no evaporador Stephan Geiger, modelo UMMSK-12, constituído por uma cuba com capacidade máxima de 6 litros de leite.

#### 2.2 - Métodos

##### 2.2.1 - Concentração do leite

Cinquenta litros de leite foram submetidos à concentração a temperatura de 50°C, durante 20 minutos, em rotação de 170 rpm e pressão de vácuo de -0,85 bar, obtendo-se 25 litros de leite concentrado. Concentraram-se 3 litros de cada vez, logo foram efetuadas 16 concentrações, transcorrendo essas concentrações em 8 horas contínuas. Após cada concentração, resfriou-se o leite rapidamente a temperatura de 4°C, que permaneceu em tanque inox com agitação constante até a elaboração do queijo.

##### 2.2.2 - Elaboração do queijo Prato com leite concentrado (queijo teste)

O leite concentrado (25 litros) foi aquecido a 37,5°C, e posteriormente foram adicionados 175 g de proteínas lácteas (Dairy Pro, Germinal), com a finalidade de melhorar a textura, uma vez que foi retirada grande parte da gordura do leite, 32 mL de coalho (Há-La), 20 mL da solução de cloreto de cálcio a 40%, e 0,2 g de cultura iniciadora do tipo *Streptococcus termófilos* e *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* (Lyofast CMS 0.19, Germinal). O começo da coagulação ocorreu após 4 minutos da adição do coalho e continuou durante 11 minutos. Procedeu-se então o corte da coalhada até atingir o tamanho de grão de arroz, e posteriormente a retirada do soro (17 litros). A massa obtida não foi lavada, sendo colocada numa bandeja e pesada. Sobre essa massa dentro da bandeja efetuou-se a pré-prensagem durante 15 minutos, utilizando como pressão, duas vezes o peso da massa obtida. Passado esse tempo foi adicionado o sal na massa, na proporção de 2%, a qual foi colocada em formas (11,5 cm comprimento; 6,8 cm largura; 7,5 cm de altura), e posteriormente levadas à prensa hidráulica para a primeira prensagem em pressão de 20lb/pol<sup>2</sup> durante 60 minutos. Transcorrido o tempo inverteu-se os queijos dentro das formas, e na prensa as formas. Iniciou-se a segunda prensagem em pressão de 30lb/pol<sup>2</sup> durante 120 minutos. Retiraram-se os queijos das formas, os quais foram levados a câmara de maturação (MENONCIN) onde permaneceram durante 60 dias. Os queijos não foram embalados a vácuo e permaneceram os dois primeiros dias a 15°C entre 85% e 90% umidade relativa, nos 58 dias restantes permaneceram na

<sup>1</sup> Curso de Engenharia de Alimentos. URI-Campus de Erechim – RS. Av. sete de setembro, 1621. Erechim – RS, Cep. 99700-000  
<sup>1\*</sup> ajc@uricer.edu.br

mesma temperatura mas entre 80% e 85%. A umidade relativa da câmara oscilou bastante a qual promoveu acentuada desidratação no queijo.

### 2.2.3 - Elaboração do queijo Prato com leite sem concentrar (padrão).

O leite não concentrado (50 litros) foi aquecido a 37,5°C, e então se adicionou 350g de proteínas lácteas (Dairy Pro, Germinal), 32 mL de coalho (Há-La), 40 mL da solução de cloreto de cálcio a 40%, e 0,4g de cultura iniciadora do tipo do tipo *Streptococcus termófilos* e *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* (Lyofast CMS 0.19, Germinal). A coagulação começou após 15 minutos da adição do coalho e continuou durante 11 minutos. Então procedeu ao corte da coalhada até atingir o tamanho de grão de arroz, retirou-se o soro (41 litros). Os demais procedimentos foram os mesmos empregados na elaboração do queijo teste.

O queijo teste e padrão diferiram nas quantidades adicionadas de cultura pura, proteína láctea e solução de cloreto de cálcio a 40%, onde no queijo teste foi adicionada a metade. Isso ocorreu devido o leite concentrado apresentar maior teor de proteínas (principalmente do soro) e minerais como é apresentado na Tabela 1. A razão pela qual o queijo teste apresentou menor quantidade decultura pura, é que ocorreu um engano na hora de pesar.

**Tabela 1 -** Composição centesimal do leite não concentrado e do leite concentrado.

Composição centesimal	Leite	Leite concentrado
Umidade (%)	90,86	81,00
Lactose (%)	2,13	4,01
Proteína (%)	4,03	8,84
Gordura (%)	1,30	2,70
Cinzas (%)	0,68	1,76

### 2.3 - Análises microbiológicas e físico-químicas

As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas logo após a segunda prensagem (zero dia) e no 7°, 15°, 30°, 45° e 60° dia de armazenamento.

#### 2.3.1 - Microbiológicas

##### Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas

A técnica de semeadura utilizada foi a de profundidade (Pour-plate) utilizando Plate Count Ágar (PCA), sendo incubadas a 32°C durante 48 horas (Silva et al., 1997).

##### Bactérias lácticas

A técnica de semeadura utilizada foi a de profundidade com sobrecamada, utilizando Agar de Man, Rogosa, Sharpe (MRS), sendo incubadas a 30°C durante 72 horas, com pré-leitura em 48 horas (Silva et al., 1997).

##### 2.3.2 - Físico-Químicas

O pH, proteínas, lipídios, cinzas, cloretos, umidade, lactose e acidez titulável (% ácido láctico), foram determinados conforme metodologia descrita pelo IAL (1985).

A atividade de água foi determinada à temperatura de 22°C conforme procedimento padrão do aparelho Aqualad CX-2 Water Activity System.

##### 2.4 - Análises Estatísticas

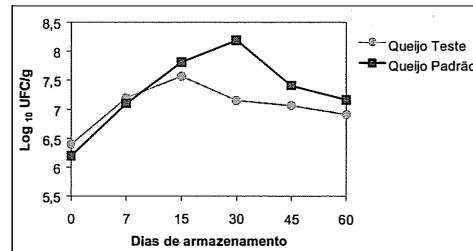
Os queijos teste e padrão foram elaborados duas vezes e todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente através de cálculos de média, desvio padrão, análise de variância e teste de Tukey com significância ao nível de 5% ( $p<0,05$ ) (Campos, 1983).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 - Análises microbiológicas

##### Bactérias lácticas

Na Figura 1 são apresentados as contagens obtidas das bactérias lácticas no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.



**Figura 1 -** Valores médios das contagens das bactérias lácticas obtidas nos queijos teste e padrão durante o período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

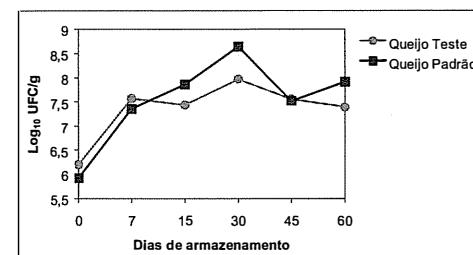
Quando do corte da coalhada as bactérias lácticas ficam retidas nos cubos formados, sendo influenciada sua presença pelo grau de dessoragem parcial da massa (Furtado, 2005). Como no queijo

teste ocorreu pouca retirada de soro (17 litros), quando do corte da coalhada, a perda de bactérias lácticas foi menor do que ocorreu no queijo padrão onde foram retirados 41 litros de soro. Sendo esse o motivo pelo qual inicialmente o queijo teste apresentou contagens maiores de bactérias lácticas do que o queijo padrão (Figura 1).

Diversos fatores estão relacionados com o crescimento bacteriano durante o armazenamento do queijo, destacando-se o pH, a umidade e a  $a_w$  (Nascimento et al., 2001). Do 15° dia em diante o queijo teste apresentou contagens de bactérias lácticas inferiores as encontradas no queijo padrão, mas não ocorreu diferença significativa em todos os dias analisados (Figura 1). Mesmo sendo menores essas contagens, demonstram que ocorreu um bom desenvolvimento da cultura pura, pois foi adicionado à metade da quantidade, e os valores de umidade encontrados no queijo teste foram menores e significativos durante todo o período de armazenamento, (Figura 4), assim como os valores de  $a_w$  que também foram menores, mas significativos no 45° e 60° dia (Tabela 3).

##### Bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas

Na Figura 2 são apresentados as contagens obtidas das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.



**Figura 2 -** Contagens das bactérias mesófilas aeróbias obtidas nos queijos teste e padrão durante o período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

Novamente no queijo teste ocorreu menor desenvolvimento de bactérias, mas não houve diferença significativa durante todo o período de maturação nas contagens obtidas das bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas entre o queijo teste e padrão (Figura 2).

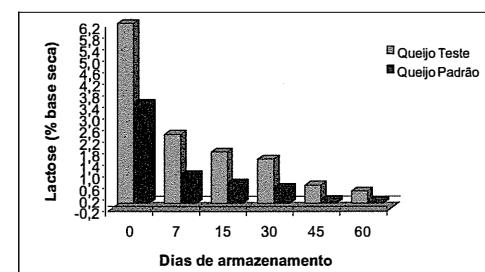
Queijo prato com umidade de 44% depois de sua saída da salmoura apresentou contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas de  $\log_{10}$  7,17 UFC/g (Gollo et al., 2003), o queijo teste do 7° dia em diante apresentou contagens de bactérias

heterotróficas aeróbias mesófilas maiores do que  $\log_{10}$  7,17 UFC/g em valores de umidade menores do que 44% (Figura 4). Estes resultados demonstraram a influência do grau de dessoragem parcial ocorrido na massa (Furtado, 2005), o qual proporcionou no queijo teste maior retenção de bactérias na coalhada, e essas encontraram condições para desenvolverem-se.

## 3.2 - Analises físico-químicas

### Lactose

Na Figura 3 são apresentados os resultados das análises de lactose (% base seca) obtidos no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.



**Figura 3 -** Valores de lactose (% base seca), obtidos nos queijos teste e padrão após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

As amostras do queijo teste apresentaram maior quantidade de lactose em todos os dias analisados, em relação as amostras do queijo padrão (Figura 3), e todos os valores apresentaram diferenças significativas ( $p<0,05$ ). Essa maior quantidade de lactose é decorrente da concentração do leite (Tabela 1), somada a menor saída de soro da massa, pois a massa não foi lavada após a retirada do soro.

### Acidez

Na Tabela 2 são apresentados os valores de acidez (ácido láctico anidro), obtidos nos queijos teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

Com o decorrer do tempo de armazenamento, ocorreu aumento na acidez nos queijos teste e padrão. No 45° e no 60° dia de maturação os valores numéricos de acidez do queijo teste foram maiores do que no queijo padrão, apresentando em ambos os dias analisados diferença significativa (Tabela 2). Essa maior

acidez encontrada no queijo teste do 45º dia em diante, estaria relacionada com a maior quantidade de lactose (Figura 3) e o bom desenvolvimento das bactérias lácticas (Figura 1).

Queijo Prato elaborado com leite ultrafiltrado, apresentou acidez de 0,71% no 10º dia de armazenamento a 7°C (Narimatsu *et al.*, 2002). O queijo teste no 7º dia e no 15º dia de armazenamento apresentou valor de acidez maior do que 0,71% (Tabela 2). Essa maior acidez encontrada em menor espaço de tempo, seria decorrente da temperatura de armazenamento empregada que foi o dobro (15°C) e a cultura pura adicionada que se caracteriza por apresentar boa capacidade de desdobrar a lactose em ácido láctico.

#### pH

Na Tabela 3 são apresentados os valores de pH obtidos no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

O queijo teste apresentou valores de pH maiores do que o queijo padrão, logo depois de elaborado apresentando diferença significativa e no 30º dia de armazenamento sem diferença significativa (Tabela 3).

O declínio do pH durante o período de armazenamento está relacionado com a transformação da lactose em ácido láctico, pela flora

**Tabela 2** - Valores de acidez (em ácido láctico anidro) nos queijos teste e padrão logo após a sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

	Dias de armazenamento					
	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
Acidez (%)	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
Queijo teste	0,16 <sup>a</sup> (±0,04)	0,78 <sup>a</sup> (±0,35)	0,84 <sup>a</sup> (±0,35)	1,13 <sup>b</sup> (±0,17)	2,32 <sup>a</sup> (±0,16)	3,36 <sup>a</sup> (±0,69)
Queijo padrão	0,30 <sup>a</sup> (±0,13)	0,90 <sup>a</sup> (±0,61)	1,20 <sup>a</sup> (±0,63)	1,61 <sup>a</sup> (±0,13)	1,75 <sup>b</sup> (±0,33)	2,52 <sup>b</sup> (±0,37)

NOTA: <sup>a, b</sup> são analisados na vertical e letras diferentes apresentam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

**Tabela 3** - Valores de pH obtidos nos queijos teste e padrão logo após sua elaboração e durante os 60 dias de armazenamento a 15°C.

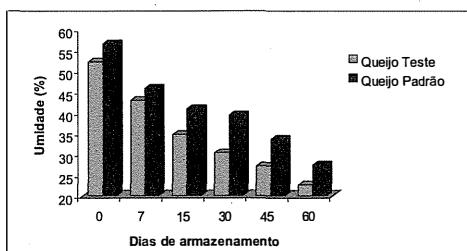
	Dias de armazenamento					
	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
pH	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
Queijo teste	6,74 <sup>a</sup> (±0,23)	5,99 <sup>a</sup> (±0,23)	5,82 <sup>a</sup> (±0,21)	5,75 <sup>a</sup> (±0,34)	5,65 <sup>a</sup> (±0,34)	5,50 <sup>b</sup> (±0,12)
Queijo padrão	6,48 <sup>b</sup> (±0,31)	6,19 <sup>a</sup> (±0,39)	5,88 <sup>a</sup> (±0,06)	5,74 <sup>a</sup> (±0,05)	5,66 <sup>a</sup> (±0,04)	5,61 <sup>a</sup> (±0,07)

NOTA: <sup>a, b</sup> são analisados na vertical e letras diferentes apresentam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

presente no queijo (Minussi *et al.*, 1995). No queijo teste e padrão foram observados essa transformação, uma vez que ocorreu declínio do pH (Tabela 3) e diminuíram os valores de lactose (Figura 3). No 60º dia de armazenamento essa transformação ficou bem caracterizada no queijo teste pois o valor de pH foi menor (Tabela 3), a acidez maior (Tabela 2) e a quantidade de lactose entre o 45º e 60º dia diminui (Figura 3).

#### Umidade

Na Figura 4 são apresentados os valores de umidade (%) obtidos no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.



**Figura 4** - Valores de umidade obtidos nos queijos teste e padrão durante o período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

Em todos os dias analisados o queijo teste apresentou menor conteúdo de umidade em relação ao queijo padrão, ocorrendo diferença significativa em todos os dias analisados (Figura 2). Esse menor valor apresentado pelo queijo teste logo após sua elaboração, é consequência do processo de concentração que o leite foi submetido.

Em decorrência das peças do queijo padrão e teste serem pequenas (664g massa, 11,5 cm comprimento, 6,8 cm largura e 7,5 cm de altura) e não serem embaladas a vácuo, no 15º dia de armazenamento o valor de umidade do queijo teste foi de 34,68% (Figura 4). Esse valor é inferior aos valores médios encontrados por FURTADO & LOURENÇO (1994), em queijo Prato brasileiro que variaram de 42% a 44%.

O queijo pode ser classificado de acordo com seu conteúdo de umidade em : baixa umidade (umidade até 35,9%), média umidade (entre 36% a 45,9%), e queijo de alta umidade (entre 46% a 54,9%), conforme regulamento técnico de identidade e qualidade para produtos lácteos (ANVISA, 1996). O queijo teste logo após sua elaboração seria classificado como de alta umidade (52,10%), no 7º dia de armazenamento de média umidade (42,78%), e do 15º dia em diante de baixa umidade (34,68%).

#### Atividade de água ( $a_w$ )

Na Tabela 4 são apresentados os valores de

$a_w$  obtidos no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante o período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

O queijo teste apresentou valores de  $a_w$  menores, em relação as encontradas no queijo padrão em todos os dias analisados, mas ocorreu diferença significativa na análise realizada logo após elaborado o queijo, no 45º e no 60º dia de armazenamento (Tabela 4).

A maioria dos queijos após sua elaboração apresenta valores de  $a_w$  entre 0,94 e 0,98 (Westergaard, 1994). O queijo teste após sua elaboração e no 7º e 15º dia de armazenamento apresentou valores de  $a_w$  dentro faixa da maioria dos queijos, mesmo apresentando menor conteúdo de umidade (Figura 4). Do 30º dia em diante os valores de  $a_w$  diminuíram e ficaram abaixo 0,94, decorrente da desidratação ocorrida no queijo dentro da câmara.

Em queijos o valor mínimo de  $a_w$  requerido para o desenvolvimento das bactérias é 0,90 e 0,91 com exceção do *Staphylococcus aureus* cujo valor é de 0,86 (Peresi *et al.*, 2001). No 30º dia de armazenamento o queijo teste apresentou valor de  $a_w$  0,89 que inibiria o desenvolvimento da maioria das bactérias. Importante salientar que em baixos valores de  $a_w$  (Tabela 4) encontrados do 30ºdia em diante e umidade do 15º dia em diante (Figura 4) no queijo teste, a cultura pura adicionada se desenvolveu.

**Tabela 4** - Valores de  $a_w$  obtidos no queijo teste e no queijo padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de armazenamento a temperatura de 15°C.

$a_w$	Dias de armazenamento					
	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
Queijo teste	0,98 <sup>b</sup> (±0,01)	0,95 <sup>a</sup> (±0,01)	0,94 <sup>a</sup> (±0,01)	0,89 <sup>a</sup> (±0,02)	0,88 <sup>b</sup> (±0,01)	0,86 <sup>b</sup> (±0,01)
Queijo padrão	0,99 <sup>a</sup> (±0,01)	0,96 <sup>a</sup> (±0,01)	0,95 <sup>a</sup> (±0,01)	0,92 <sup>a</sup> (±0,01)	0,91 <sup>a</sup> (±0,01)	0,90 <sup>a</sup> (±0,01)

NOTA: <sup>a, b</sup> são analisados na vertical e letras diferentes apresentam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

**Tabela 5** - Valores médios de cloretos (%) encontrados no queijo teste e padrão durante período de armazenamento de 60 dias a temperatura de 15°C.

	Dias de armazenamento					
	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
Cloretos (%)	Zero	7°	15°	30°	45°	60°
Queijo teste	1,91 <sup>a</sup> (±0,01)	2,01 <sup>a</sup> (±0,02)	2,03 <sup>a</sup> (±0,03)	2,23 <sup>b</sup> (±0,01)	2,28 <sup>b</sup> (±0,04)	2,31 <sup>b</sup> (±0,01)
Queijo padrão	1,51 <sup>b</sup> (±0,06)	1,78 <sup>b</sup> (±0,01)	1,96 <sup>a</sup> (±0,03)	2,49 <sup>a</sup> (±0,04)	2,85 <sup>a</sup> (±0,11)	2,90 <sup>a</sup> (±0,28)

NOTA: <sup>a, b</sup> são analisados na vertical e letras diferentes apresentam diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

## Cloreto

Na Tabela 5 são apresentados os valores de cloreto obtidos no queijo teste e padrão logo após sua elaboração e durante período de 60 dias de maturação a temperatura de 15°C.

Os valores de cloreto nas amostras do queijo teste variaram de 1,91% a 2,31%, durante o período de maturação (Tabela 5). O queijo teste apresentou menores valores de cloreto, em relação ao queijo padrão, não ocorrendo diferença significativa somente no 15º dia. Essa diferença ocorreu em virtude da não correta homogeneização do sal na massa quando foi adicionado após a pré-prensagem, pois os queijos não foram colocados em salmoura.

Queijo prato elaborado com leite integral colocado em salmoura, no 30º de armazenamento, apresentou valor de cloreto entre 1,6% a 1,9% (Furtado & Lourenço Neto, 1994). Somente após sua elaboração (zero dia), o queijo teste apresentou valor de cloreto dentro da faixa de 1,6% a 1,9%, do 7º dia em diante os valores foram superiores, em decorrência da desidratação ocorrida no queijo teste, durante o período de armazenamento.

## 4 CONCLUSÕES

O queijo elaborado com leite concentrado, apresentou contagens de bactérias láticas menores do que a do queijo elaborado com leite sem concentrar, em decorrência de se ter inoculado a metade da quantidade, porém não ocorreu diferença significativa em todos os dias. Isto demonstra que o queijo elaborado com leite concentrado apresenta boas condições para o desenvolvimento de bactérias láticas.

O queijo elaborado com leite concentrado, apresentou maior teor de lactose durante todo o período de armazenamento, em relação ao queijo elaborado com leite sem concentrar.

Somente no 60º dia de armazenamento o queijo elaborado com leite concentrado, apresentou valor de pH significativamente menor, em relação ao queijo elaborado com leite sem concentrar.

No 45º e no 60º dia de armazenamento, o queijo elaborado com leite concentrado, apresentou maior valor de acidez do que o queijo elaborado com leite sem concentrar, sendo significativos esses valores.

Durante todo o período de armazenamento, o queijo elaborado com leite concentrado apresentou teores de umidade menores e significativos, em relação aos teores apresentados pelo queijo elaborado com leite sem concentrar.

Do 30º dia de armazenamento em diante, o queijo elaborado com leite concentrado apresentou valores de  $a_w$  menores, ao valor mínimo necessário para desenvolvimento de bactérias.

## SUMMARY

Lactic and mesophilic bacteria, lactose, acidity, pH, water activity, moisture and chloride in Prato cheese elaborated with reduced fat content and concentrated milk

Milk with 1,3% of fat was concentrated for 20 minutes the temperature of 50°C, on rotation of 170 rpm and pressure of vacuum of -0,85 bar. After Prato cheese it was elaborated and it was accompanied the behavior of the lactic bacteria and mesophilic aerobe heterotrophic, the lactose, acidity, pH,  $a_w$ , moisture and chloride values during the 60 days of storage to 15°C and relative humidity among 80% to 85%. The microbial and physico-chemical analyses were accomplished just after having elaborated the cheese and in the 7°, 15°, 30°, 45° and 60° day of storage. The cheese elaborated with concentrated milk (tests), it presented superior values of lactose and acidity, when compared with the values of the cheese elaborated with milk without concentrating (control). The countings of the lactic bacteria and mesophilic aerobe heterotrophic found during the storage period in the cheese test, they were smaller than found them in the cheese control. The pure culture added in the cheese test grew well, even in low moisture and  $a_w$  values.

**Keywords:** acidity, lactic bacteria, lactose, Prato cheese, concentrated milk

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS (ANVISA) Portaria 146(1), de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos**. Ministério da agricultura. Disponível em: <http://www.cnpq.br/legislacao/industria.html>. Acesso: 21/06/2005.
- BLAIS,A., & BOULET, P. Leches concentradas y leche en polvo. In: AMIOT, J. Ciencia y tecnología de la leche. Ed. Acribia, S.A.España 297-333p. 1991.
- CAMPOS, G. H. **Estatística experimental não paramétrica**. 4. ed. Piracicaba, São Paulo: ESALQ, 1983. 349p.
- CUNHA, C. R. D. A., SPADOTI, L. M., ZACARCHENCO, P. B.; VIOTTO, W. H. Efeito do fator de concentração do retentado o rendimento de queijo minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Campinas, v. 22, p. 76-81, 2002.
- FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Revista leite e derivados**. v. 15, n. 77, 2004.
- FURTADO, M. M. A formação de olhaduras em queijos semiduros através da fermentação dos citratos. **Revista industria de laticínios** p 32-39, 2002.
- FURTADO, M. M. & LOURENÇO NETO, J. P. Estudo rápido sobre a composição média dos queijos Prato e Minas no mercado. **Boletim do Leite**, n. 605, p. 4-38, 1979.
- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. **Tecnologia de Queijos – Manual técnico para produção industrial de queijos**. São Paulo, Dipemar, 1994. 118p.
- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos causas e prevenção**. Fonte Comunicações e Editora, São Paulo - SP, 2005, 200p.
- GOLLO, R., CANSIAN, R. L., VALDUGA, E. Identificação de pontos críticos de controle no processamento dos queijos prato e mussarela. **Brazilian Journal of food technology**. v. 6, n. 1, p. 43-51, 2003.
- GRAPPIN, R.; RANK, T.C.; OLSON, N.F. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A Review. **Journal of Dairy Science**. v. 68, n. 3, p. 531-540, 1985.
- IAL – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3ª ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p. (Volume 1, Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos).
- KATSUDA, M. S.; MIGLIORANZA, L. H. S.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; SCOTT, R. Cheesemaking – enzimology or bacteriology. **Process Biochemistry**, v. 7, n. 11, p. 33-36, 1999.
- LABUZA, T. P.; ACOTT, K.; TATINI, S. R.; LEE, Y. Water activity determination: a collaborative study of different methods. **Journal of Dairy Science**, v.41. p. 910-917, 1976.
- Mc. GUGAN, W. A. B., LARMOND, E. Influence of volatile and non volatile fractions on intensity of Cheddar cheese flavor. **Journal of Dairy Science**. v. 62, p. 398-403, 1977.
- MINUSSI, R.C., FURTADO, M.M., MOSQUIM, M.C.A V. Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo prato. **Rev. Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 50, n. 291, p. 31-42, 1995.
- NASCIMENTO, M. G. F., NASCIMENTO, E. R., CUNHA, C. P., CORBIA, A. C. G. Estudo transversal sobre alguns fatores de risco na contaminação natural de coliformes fecais em queijo minas frescal. **Higiene Alimentar**. v. 15. n. 86, p.55-60, 2001.
- NARIMATSU, A., DORNELLAS, J. R. F., SPADOTI, L. M., PIZAIA, P. D., ROIG, S. M. Avaliação da proteólise e do rendimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, 23(supl), p. 177-182, 2002.
- PERESI, J. M., GRACIANO, R. A. S., ALMEIDA, I. A. Z. C., LIMA, S. I., RIBEIRO, A. K., CARVALHO, I. S. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidades microscópicas, microbiológicas e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**. v.15, n. 83, p. 63-70, 2001.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27, n. 2, p. 1-18, 2004.
- SABOYA, L. V., OLIVEIRA, A. J., FURTADO, M. M., SPADOTI, L. M. Efeitos físico-químicos da adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 18, n. 4, p. 368-378, 1998.
- SARANTOPOULOS, C. I. L. L., OLIVEIRA, L. M., CANAVESI, E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas. CETEA/ITAL, 2001, 213p.
- SBAMPATO, C. G., FERRARI, M., CARVALHO, E. P., PINTO, S. M., MENDONÇA, A. T. Composição físico-química e microbiológica do queijo mussarela comercializado na cidade de Lavras, MG. **XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. p. 179-182, 1998.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos. São Paulo, Livraria Varela, 1997, 295 p.
- STEFFENS, J., FINZER, J. R. D., CICHOSKI, A. J., REZENDE, D. F. Influencia da concentração do leite na reologia do queijo tipo Prato. **Ciência & Engenharia**, v. 14, n. 2, p. 43-49, 2005a.
- STEFFENS, J., FINZER, J. R. D., CICHOSKI, A. J., REZENDE, D. F. Confecção de queijo tipo Prato com leite concentrado. **Leite e Derivados**, n. 83, p. 20-22, 2005b.
- WESTERGAARD, V. **Milk powder technology, evaporation and spray drying**. Copenhagen: NIRO A/S. 1994, 156p.

*A melhor companhia  
para o seu produto*

*Os produtos Macalé possuem mais do que  
a experiência de uma empresa pioneira,  
possuem antes a qualidade de quem  
soube se antecipar ao futuro.*

- Coalhos ● Fermentos ● Aromas
- Corantes ● Estabilizantes ● Reagentes
- Conservantes ● Polpas de frutas ● Vidrarias
- Fórmulas diversas ● Meios de cultura ● Uniformes

Faça do MACALE seu parceiro em ingredientes e acessórios para seu laticínio.

# MACALE

Distribuidor Autorizado

**CHR HANSEN**

Produtos Macale Ltda.  
Rua Humberto de Campos, 47744 - Santa Terezinha  
CEP 36045-450 - Juiz de Fora - MG  
Telefones: (32) 3224-3035  
E-mail: [macalef@terra.com.br](mailto:macalef@terra.com.br)

## BIODISPONIBILIDADE E ESTABILIDADE DO LEITE EM PÓ ENRIQUECIDO COM FERRO

Bioavailability and stability of iron enriched dry milk

José Carlos Gomes<sup>1</sup>  
Fabricia Queiroz Mendes<sup>2</sup>  
Conceição Angelina dos Santos<sup>3</sup>

### RESUMO

O leite em pó foi enriquecido com duas fontes diferentes de ferro: sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato. As fontes de ferro foram adicionadas antes e após a secagem do leite. Ao leite tipo pasteurizado adicionou-se 1,5 mg de ferro por 100 mL de leite, seguido de concentração até redução de 50 % do volume e secagem em spray-dryer. Ao leite em pó foram adicionados 12 mg de ferro por 100 g de leite em pó, de forma que após reconstituição, 100 mL do produto pronto para consumo fornecia 1,5 mg de ferro, equivalente a 15 % das recomendações diárias para crianças. Estudou-se as características físico-químicas, a estabilidade oxidativa e a biodisponibilidade das fontes de ferro. A estabilidade oxidativa foi avaliada pelo índice de ácido tiobarbitúrico (TBA). A biodisponibilidade do ferro foi avaliada pelo método *in vitro* baseado na solubilidade do ferro em pH 7,5 após digestão com pepsina. Quanto à forma de enriquecimento, não houve diferença entre as características estudadas. Ambos os processos mostraram-se simples e de fácil execução. Não houve diferença entre as duas fontes de ferro nas características de acidez, umidade, teores de lipídios, proteínas, lactose, cinzas e sedimentos. A estabilidade oxidativa do leite enriquecido foi maior quando se utilizou ferro aminoácido quelato e ambas as fontes diferiram do controle. O ferro aminoácido quelato apresentou maior biodisponibilidade *in vitro* (31,81 %) que o sulfato ferroso (17,41 %). A biodisponibilidade *in vivo* foi de 15,45 % para o ferro aminoácido quelato e de 8,66 % para o sulfato ferroso. O ferro aminoácido quelato mostrou ter melhor estabilidade oxidativa e melhor biodisponibilidade comparado com o sulfato ferroso, sendo uma boa fonte para o enriquecimento do leite em pó.

### I - INTRODUÇÃO

A deficiência de ferro é caracterizada pela diminuição da quantidade de ferro no organismo e ocorre quando o fornecimento deste mineral é insuficiente para suprir as necessidades metabólicas. Manifesta-se em três estágios: no primeiro estágio há diminuição das reservas de ferro; no segundo há um declínio no teor de ferro sérico e no terceiro estágio instala-se a anemia.

A anemia é caracterizada pela deficiência no tamanho ou no número de glóbulos vermelhos ou na quantidade de hemoglobina que elas contêm, trazendo como consequência à limitação das trocas de oxigênio e gás carbônico entre o sangue e as outras células do nosso corpo.

A anemia ferropriva, decorrente da deficiência alimentar de ferro, é a mais comum das carências nutricionais, atingindo quase dois bilhões de pessoas em todo o mundo, correspondendo a aproximadamente 36 % da população mundial (LIMA *et al.*, 2004). As crianças, nos primeiros anos de vida, e as gestantes constituem os grupos mais vulneráveis à anemia (BUONGERMINO SOUZA *et al.*, 1997).

No Brasil, a anemia ferropriva é reconhecida como um problema de saúde pública havendo recomendações para o enriquecimento de alimentos com ferro ao lado de outras orientações (Brasil, 1999).

O ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre, existindo em dois estados de valência: ferroso ( $Fe^{+2}$ ) e férlico ( $Fe^{+3}$ ) (FAIRWEATHER-

1 Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa

2 Engenheira de Alimentos, Magister Scienciae em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Doutoranda em Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa

3 Professor Adjunto da Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Nutrição e Saúde

TAIT, 1995a). Apresenta massa atómica de 55,847 g/mol. É essencial para todas as formas vivas, com exceção de certas bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bacillus*. Nesses organismos, as funções do ferro são desempenhadas por outros minerais, como manganês e cobalto (BEARD *et al.*, 1996).

A capacidade do organismo em excretar o ferro é extremamente limitada, sendo a absorção controlada a fim de evitar o excesso, pois tanto um suprimento inadequado como o acúmulo deste nutriente é prejudicial ao organismo. Este recurso homeostático também opera em sentido contrário, aumentando a eficiência da absorção nos casos de escassez ou de necessidades aumentadas.

Além da absorção controlada, ainda temos em diversas matrizes alimentares inibidores de absorção.

Entre os inibidores da absorção estão os polifenóis, fitatos, fosfatos e oxalatos. Os polifenóis são metabólitos secundários de origem vegetal, ricos em grupos hidroxil fenólicos que formam complexos insolúveis com ferro. Polifenóis de alto peso molecular, os taninos, presentes no chá e no café, são os maiores inibidores da absorção de ferro dos alimentos. O cálcio, em pequenas quantidades, parece aumentar a absorção de ferro, mas grandes quantidades inibem a absorção. Os fosfatos, ligados ou não a proteínas, formam complexos insolúveis com ferro e são os principais responsáveis pela baixa biodisponibilidade do ferro dos ovos, leite e derivados. Os fitatos, presentes em muitos cereais, inibem a absorção do ferro não-heme da dieta através da formação de complexo insolúvel de fitato di e tetra-férrego.

O ferro heme é prontamente absorvido pela mucosa intestinal com subsequente liberação do ferro dentro das células da mucosa (PINEDA *et al.*, 1994) e seu nível de absorção é pouco influenciado pelas reservas orgânicas de ferro ou por outros constituintes da dieta.

Os constituintes da dieta que interferem na biodisponibilidade do ferro não-heme podem ser classificados em estimuladores e inibidores da absorção de ferro. Entre os fatores estimuladores da dieta estão as carnes e os ácidos orgânicos como o cítrico, málico, tartárico, lático e, principalmente, o ácido ascórbico. O efeito da carne como estimulador relaciona-se especificamente à proteína muscular. O mecanismo não foi completamente esclarecido, mas pode estar relacionado à liberação de cisteína e de peptídios com cisteína durante o processo de digestão, formando quelatos peptídico-ferro de fácil absorção. O ácido ascórbico converte o ferro férrego em ferroso, tornando-o solúvel no meio alcalino do intestino delgado. Além disso, no pH ácido do estômago, o ácido ascórbico forma um quelato com

cloreto férrego, que permanece estável em pH alcalino. A suplementação com ácido ascórbico tem sido sugerida para melhorar a biodisponibilidade de ferro da dieta e aumentar as reservas orgânicas de ferro em mulheres em idade reprodutiva (CARDOSO & PENTEADO, 1994).

No Brasil, os estudos sobre anemia não são muitos e a maioria deles refere-se a grupos populacionais restritos. Os resultados encontrados permitem supor a existência de elevada prevalência no Brasil (BUONGERMINO SOUZA *et al.*, 1997).

No município de Viçosa, MG, SILVA (2003), em estudos com lactentes, verificou uma frequência de 57,2 % de anemia ferropriva no primeiro ano de vida, entre os anêmicos, 39,9 % foram considerados de anemia grave. MIRANDA *et al.* (2003), estudando crianças de 12 meses a 60 meses, registraram prevalência de 63,2 % de anemia e 43,5 % de anemia grave.

Um processo eficaz de aumentar a oferta de ferro na alimentação é através do enriquecimento dos alimentos. A carência de iodo na população foi solucionada pela adição de iodo ao sal, regulamentado pelas leis nº 6150 (Brasil, 1974) e nº 9005 (Brasil, 1995) que estabelecem a obrigatoriedade da adição deste nutriente. Quanto à deficiência de ferro, os primeiros passos já foram tomados. A Resolução RDC nº 344 da ANVISA, de 13 de dezembro de 2002 (Brasil, 2002) estabelece a obrigatoriedade da adição de ferro e ácido fólico às farinhas.

Por outro lado, problemas relacionados à absorção e ao metabolismo de cálcio constituem também um dos grandes problemas de saúde pública no mercado, sendo unânime entre os profissionais da área de saúde a dificilmente atinge-se a recomendação de cálcio na alimentação sem a inclusão de leite e seus derivados na dieta (Allen e Wood, 1994) devido, principalmente, ao aspecto qualitativo, isto é, devido à alta biodisponibilidade de cálcio nestes alimentos (Mahan e Arlin, 1998). Sendo assim, o leite é uma matriz alimentar de grande importância para fortificações, pois além de suprir cálcio, vitaminas, proteínas de boa qualidade, energia e outros minerais tem excelente aceitação em todas as faixas etárias; não sendo recomendado apenas em situações clínicas adversas.

Deste modo, escolheu-se o leite para adição de sais de ferro com o objetivo de aumentar o suprimento deste mineral na alimentação. Verificou-se, para efeitos práticos, a biodisponibilidade do ferro e a estabilidade do leite desidratado. No Brasil, os níveis de ferro e outros nutrientes em alimentos são regulamentados pela Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005 (Brasil, 2005).

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Preparo das amostras

Duas fontes de ferro foram adicionadas ao leite: ferro quelato (Albion Laboratories, Inc. Clearfield-Utah-USA) e sulfato ferroso heptahidratado,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , (Vetec Com. & Repr. Rio de Janeiro-BR), ambos contendo 20 % de ferro. Para facilitar os processos de pesagem e mistura, foi preparada uma pré-mistura da fonte de ferro em leite em pó, na proporção de uma parte da fonte de ferro para 20 partes de pré-mistura. Assim, cada grama de pré-mistura elaborada contém 0,01 g de ferro.

As duas fontes de ferro foram adicionadas ao leite antes e após a secagem. O leite em pó sem adição de ferro foi tomado como referência, totalizando cinco tratamentos. Todos os tratamentos foram preparados em três repetições.

Para os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado após a secagem (Figura 2), foi adicionado ao leite em pó comercial 12 mg de ferro para 100 g de amostra, de forma que, após reconstituição, na proporção de 26 g de leite em pó para 200 mL de água, de modo que cada 100 mL do produto pronto para consumo forneça 1,5 mg de ferro, equivalente a 15 % da IDR de referência para crianças.

Para os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado antes da secagem, utilizou-se o leite tipo C já pasteurizado, proveniente do Laticínio-Escola da FUNARBE/UFV, 1,5 mg de ferro para 100 mL de leite. As amostras foram concentradas até redução de 50 % do volume e desidratadas em Spray-dryer (Mini spray-dryer, Büchi Switzerland, B-191), com temperatura de entrada do ar em torno de  $180^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  e temperatura de saída em torno de  $80^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

Todas as amostras foram armazenadas em recipientes de plástico (polipropileno) revestido com papel alumínio e mantidas ao abrigo da luz. A tabela 1 resume os processos aplicados bem como as fontes de ferro.

### 2.2 - Análises físico-químicas

A reconstituição do produto foi feita

**Tabela 1 - Resumo dos tratamentos aplicados.**

Tratamentos	Fonte de ferro	Forma de secagem
A (Controle)		
B	$\text{FeSO}_4$	Após a adição da fonte de ferro
C	$\text{FeSO}_4$	Antes da adição da fonte de ferro
D	Ferro aminoácido quelato	Após a adição da fonte de ferro
E	Ferro aminoácido quelato	Antes da adição da fonte de ferro

diluindo 1 g do leite em pó em 7 g de água. A acidez titulável do leite em pó, expressa em ácido láctico, foi determinada titulando-se 1 g de amostra diluída em 7 g de água com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador. O teor de umidade foi determinado através de secagem em estufa a 95 °C até peso constante.

O teor de lipídios foi analisado com o uso do butirômetro de Teichert, conforme descrito por SILVA *et al.* (1997). O método baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento de 2,5 g de amostra, após completa dissolução em 10 mL de água, com 10 mL de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que envolvem os glóbulos de gordura, liberando-a. A liberação de calor funde a gordura o que favorece sua separação pelo extrator (álcool isoamílico). A leitura é feita diretamente na escala graduada do butirômetro após centrifugação e imersão em banho-maria.

A determinação do teor de proteínas foi baseada na determinação de nitrogênio total, empregando-se o método de Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Para conversão dos teores de nitrogênio total para percentual de proteínas, utilizou-se o fator 6,38, considerando-se a caseína como proteína predominante e o teor de nitrogênio na caseína de 15,68 % (GOMES *et al.*, 2003).

A determinação do teor de lactose foi realizada utilizando-se cloramina T, conforme descrito por GOMES *et al.* (2003). Este método tem como princípio a oxidação de açúcares redutores por hipoidito liberado durante a reação de cloramina T e iodeto de potássio.

Três gramas de leite em pó foram reconstituídos, utilizando-se 21 g de água destilada e transferido para um balão de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de sulfato de zinco a 15 % e 5 mL de NaOH 0,75 N e completou-se o volume do balão com água destilada. Deixou-se em repouso por 10 minutos e filtrou-se. Transferiu-se 5 mL do filtrado para um erlenmeyer, adicionou-se 20 mL de água destilada, 20 mL de iodeto de potássio a 10 % e 50 mL de solução de cloramina T 0,7 %. Deixou-se em repouso por 90 minutos. Adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico 2 N e titulou-se com

tiosulfato de sódio 0,1 N, utilizando solução de amido a 1 % como indicador. Foi realizada a titulação de um branco utilizando-se somente água destilada.

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 °C, conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

A determinação da quantidade de sedimentos retidos num papel de filtro. O total de sedimentos foi determinado por reconstituição e filtragem conforme descrito por SILVA *et al.* (1997). O leite em pó foi reconstituído na proporção de 1 g de leite em pó para 7 g de água, filtrado e o material retido no filtro foi pesado após secagem em estufa a 95 °C.

As concentrações de ferro no leite em pó foram determinadas após mineralização de 1 g de amostra por via úmida, utilizando-se mistura digestora nitro-perclórica na proporção de 3:1. Aqueceu-se em chapa, até fervura branca, mantendo-se esta condição até a formação de uma solução límpida. As amostras foram transferidas para balões de 100 mL, o volume foi completado com água destilada e as amostras foram armazenadas em recipientes de plástico com tampa rosqueável.

O teor de ferro foi determinado por leitura colorimétrica no comprimento de onda de 510 nm do complexo colorido formado por complexação do íon Fe<sup>+2</sup> com ortofenantrolina, conforme descrito por GOMES *et al.* (2003). Retirou-se uma alíquota de 2 mL das amostras mineralizadas e adicionou-se 2 mL de tampão ácido acético/acetato de amônio, 2 mL de cloreto de hidroxialamina a 10 % e 1 mL de solução 0,5 % de ortofenantrolina. Deixou-se em repouso por 20 minutos e procedeu-se a leitura no comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV mini 1240. A determinação de ferro foi realizada utilizando uma curva padrão previamente estabelecida. A análise dos produtos secundários de oxidação de gordura foi realizada pelo índice de TBA (ácido tiobarbitúrico), conforme descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teste é baseado na reação entre malonaldeído, produzido durante a oxidação de ácidos graxos insaturados e ácido tiobarbitúrico, que formam um pigmento róseo avermelhado, mensurável por espectrofotometria no comprimento de onda de 530 nm, e os resultados expressos em absorbância.

As amostras foram dissolvidas em clorofórmio, na proporção de 5 g para 100 mL. Foram retirados 5 mL desta solução e colocados em um tubo de centrifuga com 5 mL de ácido tricloroacético a 10 %. A mistura foi centrifugada

(International Centrifuge, modelo K, International equipament Co.) a 5000 x g por vinte minutos. Foram retirados 3 mL do sobrenadante, adicionado 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,75 % e colocado em água fervente por 10 minutos. Resfriou-se e então se procedeu a leitura no comprimento de onda de 530 nm em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV mini 1240, usando-se água destilada como referência.

A biodisponibilidade *in vitro* do ferro no leite em pó foi estimada pelo método descrito por RAO & PRABHAVATHI (1978). As amostras foram incubadas a 37 °C por 90 minutos em uma solução de pepsina-HCl (0,5 % de pepsina em HCl 0,1 N), pH 1,35. Após a incubação, o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH e as amostras foram centrifugadas (International Centrifuge, modelo K, International equipament Co.) a 5000 x g por 30 minutos. As amostras foram filtradas. O teor de ferro ionizado do filtrado foi determinado por reação colorimétrica com ortofenantrolina conforme descrito por GOMES *et al.* (2003).

A percentagem de ferro ionizável a pH 7,5, ou ferro biodisponível, foi calculado em relação aos teores de ferro determinados experimentalmente para as amostras.

Após determinada a biodisponibilidade *in vitro*, a biodisponibilidade *in vivo* foi deduzida a partir da equação de RAO & PRABHAVATHI (1978):

$$V = 0,4717T + 0,4501$$

onde V = Biodisponibilidade *in vivo*;

T = Biodisponibilidade *in vitro*. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância, com teste F. O teste T foi realizado para as amostras que obtiveram significância no teste F ao nível 1 %.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Preparo das amostras

Durante a preparação das amostras que foram secas após a adição da fonte de ferro, o sulfato ferroso apresentou, em análise visual, melhor solubilidade que o ferro aminoácido quelato. A solubilização completa dos compostos ocorreu após aquecimento, durante a etapa de concentração, e o sulfato ferroso dissolveu primeiramente que o ferro aminoácido quelato. A solubilização pôde ser observada pelo desaparecimento de pontos coloridos, uma vez que ambos compostos apresentam cores características (sulfato ferroso apresenta coloração azul esverdeada e o ferro aminoácido quelato apresenta coloração vermelho amarronzada).

Para as amostras nas quais os compostos de ferro foram adicionados após a secagem, procedeu-se a mistura até completa homogeneização, não sendo observada, visualmente, diferenças entre as duas fontes de ferro.

A adição da fonte de ferro, tanto antes quanto após a secagem, mostrou-se simples e de fácil execução, possíveis de serem instalados na indústria de leite em pó. Para adição do composto de ferro após a secagem, é necessário acrescentar uma etapa de mistura após a secagem.

#### 3.2 - Análises físico-químicas

##### 3.2.1 - Prova de reconstituição

Para todos os tratamentos, observou-se que o leite manteve-se estável, durante quatro horas, sem precipitações. Considerando que o consumo do leite é feito logo após a reconstituição, este tempo de estabilidade garante um produto de qualidade adequada para o consumidor.

##### 3.2.2 - Acidez em ácido lático

A acidez titulável do leite varia de acordo com teores de sais minerais e proteínas. O leite, ao sair do úbere, é levemente ácido, resultado da contribuição natural de seus componentes, destacando-se proteínas, fosfatos, citratos e CO<sub>2</sub>. Esta acidez original, denominada acidez titulável inicial ou natural, varia de 15° Dornic a 20° Dornic, ou 0,15 g a 0,20 g de ácido lático por 100 mL de leite. O aumento da acidez até o consumo do leite denomina-se acidez titulável adquirida e é proveniente da fermentação da lactose, formando ácidos, sendo o ácido lático o mais importante (GOMES *et al.*, 2003).

Os valores médios obtidos para acidez dos tratamentos estão mostrados na Tabela 2. Os resultados encontrados expressam a acidez dos tratamentos em percentagem de ácido lático em peso, na diluição de 1:7 (1 g de amostra para 7 g de água).

**Tabela 2** - Acidez expressa em ácido lático na diluição de 1:7 (1 g de amostra para 7 g de água).

Tratamentos	Ácido Lático % (m/m)
A	0,151 <sup>a</sup> ± 0,006
B	0,155 <sup>a</sup> ± 0,012
C	0,159 <sup>a</sup> ± 0,007
D	0,163 <sup>a</sup> ± 0,007
E	0,151 <sup>a</sup> ± 0,006

<sup>a</sup> Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a p>0,01.

Os resultados mostraram que a adição de sulfato ferroso e do ferro aminoácido quelato não promoveu variação significativa (p>0,01) na acidez expressa em ácido lático.

Utilizando dosagens de 6 mg, 12 mg, 18 mg e 24 mg de ferro por litro em leite tipo C, sendo as fontes de ferro sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato, SOGLIA (1996) também não encontrou variação significativa na acidez Dornic. Avaliou, ainda, a acidez Dornic em função do tempo de estocagem, e verificou também que não houve efeito significativo provocado pela presença de sulfato ferroso ou ferro aminoácido quelato.

##### 3.2.3 - Teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas.

Os resultados dos teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas das amostras de leite em pó enriquecido com ferro podem ser observados na Tabela 3.

Para os teores de umidade, expressos em base úmida, houve diferença significativa (p<0,01) entre os valores de umidade dos tratamentos que utilizaram leite em pó comercial, adicionado ou não de ferro, e aos tratamentos nos quais o ferro foi adicionado antes da secagem.

A diferença do teor de umidade entre os tratamentos nos quais o ferro foi adicionado após

**Tabela 3** - Valores médios dos teores de umidade, lipídios, proteínas, lactose e cinzas. Os resultados são expresso em % m/m

Trat.	Umidade	Lipídios	Proteínas	Lactose	Cinzas
A	4,97 <sup>a</sup> ± 0,09	26,67 <sup>a</sup> ± 0,29	25,27 <sup>a</sup> ± 0,30	38,89 <sup>a</sup> ± 1,91	5,81 <sup>a</sup> ± 0,06
B	1,25 <sup>b</sup> ± 0,12	26,33 <sup>a</sup> ± 0,29	26,72 <sup>a</sup> ± 1,09	42,53 <sup>a</sup> ± 0,95	6,03 <sup>a</sup> ± 0,02
C	4,92 <sup>a</sup> ± 0,08	26,17 <sup>a</sup> ± 0,29	25,51 <sup>a</sup> ± 0,33	39,44 <sup>a</sup> ± 2,80	5,86 <sup>a</sup> ± 0,04
D	1,13 <sup>b</sup> ± 0,06	27,00 <sup>a</sup> ± 0,50	26,22 <sup>a</sup> ± 1,00	42,16 <sup>a</sup> ± 0,32	5,78 <sup>a</sup> ± 0,15
E	4,98 <sup>a</sup> ± 0,08	27,33 <sup>a</sup> ± 0,29	25,58 <sup>a</sup> ± 0,50	39,44 <sup>a</sup> ± 2,52	5,62 <sup>a</sup> ± 0,29

<sup>a</sup>Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a p>0,01.

a secagem bem como no controle e os tratamentos nos quais a adição de ferro foi feita antes da secagem do leite se deve a diferenças no processo de secagem das amostras. No entanto, de acordo com a Portaria nº 369 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o teor máximo de umidade permitido para o leite em pó integral é de 3,5 % sendo que as amostras de leite em pó comerciais, adicionadas ou não de ferro, estavam com umidade deste valor.

Os tratamentos não diferiram quanto ao teor de lipídios ( $p>0,01$ ) e, de acordo com a Portaria nº 369 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), são classificadas como leite em pó integral, pois possuem um teor de lipídios totais superior a 26 % em peso, mínimo estabelecido pela legislação.

Não houve diferença significativa ( $p>0,01$ ) para os cinco tratamentos em relação ao teor de proteínas. O teor de proteínas encontrado equivale aos valores encontrados por SOGLIA (1996) e em formulações comerciais.

Também não houve diferença significativa ( $p>0,01$ ) nos teores de lactose entre os tratamentos.

Apesar de ser adicionado um composto mineral, a adição de sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato não provocou aumento significativo ( $p>0,01$ ) nos teores de cinzas, pois a quantidade de ferro adicionada necessária à fortificação é pequena em relação ao resíduo mineral fixo total.

#### 3.2.4 - Sedimentos

Os teores de sedimentos encontrados para as amostras estão demonstrados na Tabela 4. Os valores estão expressos em percentagem em peso.

**Tabela 4** - Sedimentos retidos em papel de filtro após reconstituição.

Tratamentos	Sedimentos m/m
A	1,42 <sup>a,b</sup> ± 0,03
B	1,24 <sup>b</sup> ± 0,01
C	1,35 <sup>a,b</sup> ± 0,03
D	1,58 <sup>a</sup> ± 0,01
E	1,43 <sup>a,b</sup> ± 0,12

<sup>a,b</sup> Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p>0,01$ .

Todas as amostras adicionadas de ferro não diferiram significativamente ( $p>0,01$ ) da amostra controle sem adição de ferro. As fontes de ferro utilizadas não interferiram no teor de sedimentos do leite em pó após reconstituição.

Para as amostras nas quais as fontes de ferro foram adicionadas antes da secagem, o sulfato ferroso apresentou um menor teor de sedimentos após reconstituição, devido à maior solubilidade deste durante a adição, mas não há diferença significativa ( $p>0,01$ ) entre a forma de adição para uma mesma fonte de ferro.

#### 3.2.5 - Teor de ferro

A Tabela 5 mostra o teor de ferro médio para os cinco tratamentos. Para todos os tratamentos nos quais foi adicionado ferro, o teor de ferro determinado foi superior a 15 % da IDR para 100 mL de produto pronto para consumo, preparado na proporção de 26 g de leite em pó para 200 mL de leite reconstituído. Neste caso, de acordo com a Portaria nº 31 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1998), o leite em pó pode ser considerado enriquecido ou fortificado com ferro.

**Tabela 5** - Teor de ferro determinado por espectrofotometria após reação com ortofenantrolina.

Tratamentos	Teor de ferro (mg/g)	% IDR de ferro por 100 mL de produto pronto para consumo
A	0,026 <sup>a</sup> ± 0,009	3,25
B	0,147 <sup>b</sup> ± 0,006	18,33
C	0,143 <sup>b</sup> ± 0,004	17,83
D	0,126 <sup>b</sup> ± 0,005	15,71
E	0,124 <sup>b</sup> ± 0,005	15,46

<sup>a,b</sup> Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p>0,01$ .

Entretanto, o teor de ferro determinado para o leite em pó sem adição deste mineral é superior ao teor encontrado por SOGLIA (1996), que foi de 1,1 mg/kg de leite (0,0011 mg/g). Também foi superior ao citado por SCHLIMME & BUCHHEIM (2002), que é de 0,3 mg de ferro por litro de leite ou, considerando que 26 g de leite em pó serão reconstituídos formando 200 mL de leite, 0,0024 mg de ferro por grama de leite em pó.

#### 4.2.6 - Efeito na oxidação de gordura

A estabilidade oxidativa do leite em pó, expressa pelo índice de TBA, foi influenciada pela adição das fontes de ferro (Tabela 6), sendo a estabilidade oxidativa do aminoácido quelato superior à do sulfato ferroso. Em relação à forma

de adição de ferro, antes ou após a secagem do leite, para uma mesma fonte de ferro, não houve diferença significativa ( $p>0,01$ ).

Estes resultados estão coerentes com os encontrados por MIRANDA (1999) que avaliou o efeito do enriquecimento de ferro em alimento a base de leite em pó e fubá de milho. A oxidação lipídica observada foi maior quando adicionado sulfato ferroso quando comparado ao ferro aminoácido quelato. Segundo GAUCHERON (2000), sais de ferro produzem grande oxidação de lipídios e os quelatos de ferro uma oxidação menor. Isto pode ser explicado pela menor reatividade do íon ferro na molécula do ferro aminoácido quelato. O íon permanece ligado às duas moléculas de glicina, não estando disponível para catalisar as reações de oxidação lipídica.

**Tabela 6** - Medida da estabilidade oxidativa expressa pelo índice de TBA.

Tratamentos	Absorbância a 530nm
A	0,120 <sup>a</sup> ± 0,015
B	0,264 <sup>b</sup> ± 0,009
C	0,251 <sup>b</sup> ± 0,004
D	0,189 <sup>c</sup> ± 0,013
E	0,192 <sup>c</sup> ± 0,008

<sup>a,b,c</sup> Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p>0,01$ .

A oxidação lipídica causa alterações sensoriais no alimento devido ao desenvolvimento do sabor de ranço e a medida da oxidação lipídica pelo teste de TBA tem sido correlacionada positivamente com a presença de sabores indesejáveis no alimento (GAUCHERON, 2000).

Esta correlação positiva pode ser observada por MIRANDA (1999), que observou diferença na aceitação de um alimento à base de leite em pó e fubá enriquecido com ferro aminoácido quelato e com sulfato ferroso, assim como entre os níveis de ferro utilizados no enriquecimento.

SOGLIA (1996) ao verificar a estabilidade oxidativa, expressa pelo índice de TBA, do leite pasteurizado, observou influência da adição das fontes de ferro (ferro aminoácido quelato e sulfato ferroso), porém não ocorrendo diferença significativa entre as fontes. Foi observado diferença significativa entre as dosagens de ferro utilizadas. Entretanto, na avaliação sensorial, que foi realizada por um painel de seis provadores treinados, utilizando-se um método descritivo, verificou-se diferença significativa entre as fontes de ferro, porém o efeito dos diferentes níveis de adição de ferro não foi significativo. Neste estudo, a avaliação sensorial realizada, as amostras foram

avaliadas para sabor oxidado, com uso de uma escala estruturada que avaliava a percepção do sabor metálico (oxidado) e variava de "imperceptível" a "muito pronunciado". A média geral atribuída ao leite enriquecido com ferro aminoácido quelato foi semelhante ao leite sem adição de ferro, obtendo-se classificação de "moderadamente perceptível". Para o sulfato ferroso, a média geral foi considerada "perceptível". Outros estudos utilizando ferro aminoácido quelato também demonstraram que este fortificante provoca poucas mudanças nas características sensoriais do produto, não afetando a aceitabilidade dos mesmos (TUMA *et al.*, 2003; OSMAN & AL-OTHAIMEEN, 2002).

#### 3.2.7 - Biodisponibilidade *in vitro*

A eficácia de uma suplementação ou fortificação com ferro pode ser previda por estudos de biodisponibilidade (OLIVARES *et al.*, 1997). A determinação de ferro ionizado a pH 7,5 tem sido útil para predizer a biodisponibilidade de ferro em humanos. Assume-se que, em pH estomacal de 1,35, a maior parte do ferro encontra-se numa forma ionizável e solúvel. Quando o pH é aumentado para o pH duodenal de 7,5, a maior parte do ferro torna-se insolúvel, permanecendo em solução a parte do ferro ionizável e o ferro ligado a componentes da dieta que elevam a absorção férrea (NAYAK & NAIR, 2003).

RAO & PRABHAVATHI (1978), em estudos *in vitro*, observaram que a presença de ácido ascórbico e extrato de carne aumentam o teor de ferro ionizável a pH 7,5, enquanto que a presença de fitatos e taninos diminui, semelhante aos efeitos destes fatores em absorção de ferro em humanos.

Os resultados observados para a biodisponibilidade de ferro *in vitro*, medido a pH 7,5, mostram uma maior biodisponibilidade do ferro aminoácido quelato ( $p<0,01$ ) em relação ao sulfato ferroso (Tabela 7). A média da biodisponibilidade *in vitro* obtida para o ferro aminoácido quelato foi de 31,81 % e para o sulfato ferroso foi de 17,41 %.

Não houve diferença significativa ( $p>0,01$ ) entre a biodisponibilidade *in vivo* deduzida do sulfato ferroso adicionado ao leite e do ferro naturalmente presente no leite. O valor encontrado para a biodisponibilidade do ferro no leite, sem fortificação, foi de 7,42 %, valor inferior a 10 %, citado por CARDOSO E PENTEADO (1994). No entanto, são superiores aos encontrados por STEKEL *et al.* (1986) e semelhantes ao encontrado por NAYAK & NAIR (2003). STEKEL *et al.* (1986) encontraram uma absorção variando de 2,9 % a 5,1 % para o sulfato ferroso, utilizando estudos de mono-isótopo e

duplo-isótopos, em leite bovino, com concentrações variando de 10 mg a 19 mg de ferro por litro.

**Tabela 7** - Biodisponibilidade de ferro in vitro e biodisponibilidade *in vivo*, deduzida conforme equação de RAO & PRABHAVATHI.

Tratamentos	Biodisponibilidade (%) <i>in vitro</i>	Biodisponibilidade (%) <i>in vivo</i> , deduzida
A	14,79 <sup>a</sup> ± 3,33	7,42
B	17,76 <sup>a</sup> ± 5,54	8,83
C	17,07 <sup>a</sup> ± 5,87	8,50
D	31,91 <sup>b</sup> ± 7,72	15,50
E	31,70 <sup>b</sup> ± 7,11	15,40

<sup>a,b</sup>Médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem significativamente a  $p>0,01$ .

Não houve diferença significativa ( $p>0,01$ ) entre a biodisponibilidade *in vivo* deduzida do sulfato ferroso adicionado ao leite e do ferro naturalmente presente no leite. O valor encontrado para a biodisponibilidade do ferro no leite, sem fortificação, foi de 7,42 %, valor inferior a 10 %, citado por CARDOSO E PENTEADO (1994). No entanto, são superiores aos encontrados por STEKEL *et al.* (1986) e semelhantes ao encontrado por NAYAK & NAIR (2003). STEKEL *et al.* (1986) encontraram uma absorção variando de 2,9 % a 5,1 % para o sulfato ferroso, utilizando estudos de mono-isótopo e duplo-isótopos, em leite bovino, com concentrações variando de 10 mg a 19 mg de ferro por litro.

Uma maior biodisponibilidade do ferro aminoácido quelato também foi encontrada por PINEDA *et al.* (1994), que avaliaram os efeitos do ferro aminoácido quelato em comparação com o sulfato ferroso na recuperação de anemia em adolescentes e por CORNBLUTH SZARFAC *et al.* (2001) em estudo com gestantes.

Entretanto estes resultados discordam daqueles obtidos por SOGLIA (1996) que avaliou o ganho de hemoglobina em ratos, após um período de depleção, utilizando leite tipo C enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato. O ganho de hemoglobina não diferiu significativamente entre as fontes de ferro utilizadas, quando comparados em cada nível de adição. MIRANDA (1999) encontrou resultados semelhantes aos de SOGLIA (1996) para um alimento a base de leite em pó e fubá de milho enriquecido com sulfato ferroso e ferro aminoácido quelato. Tanto o sulfato ferroso quanto o ferro aminoácido quelato tem sido eficientes no combate ou prevenção da deficiência de ferro.

Usando a absorção obtida no presente estudo e assumindo o consumo diário de 750 mL de leite (OLIVARES *et al.*, 1997) fortificado com 15 mg/L, a quantidade de ferro absorvido será de 1,74 mg de ferro diariamente para o ferro aminoácido quelato e de 0,97 mg de ferro para o sulfato ferroso. Esta quantidade de ferro absorvido supera as necessidades diárias de ferro do organismo para crianças, que foram estabelecidas em 1 mg por dia (NRC, 1989). Baseado nestes valores, uma quantidade menor de ferro poderia ser adicionada ao leite. Neste caso, o leite não seria mais considerado pela legislação como fortificado e sim como fonte deste mineral.

#### 4 - CONCLUSÕES

O enriquecimento de leite com ferro indicaram as seguintes conclusões:

O enriquecimento do leite em pó com as duas fontes de ferro utilizadas foi obtido com sucesso. Ambos os processos tecnológicos mostraram-se simples e de fácil execução em laboratório. A forma de enriquecimento, antes ou após a secagem do leite, não interferiu nas características físico-químicas, estabilidade lipídica ou biodisponibilidade do ferro *in vitro*. As fontes de ferro não afetaram as características físico-químicas de acidez, umidade, teores de lipídios, proteínas, lactose, cinzas e sedimentos retidos em papel de filtro após reconstituição. A estabilidade oxidativa, ou estabilidade lipídica, do leite enriquecido com ferro aminoácido quelato foi maior que a do sulfato ferroso, porém menor que a do controle. Desta forma, o ferro aminoácido quelato provoca menores alterações oxidativas no alimento, conservando suas características sensoriais por um período maior de tempo. A biodisponibilidade *in vitro* do ferro aminoácido quelato foi maior que a do sulfato ferroso.

#### ABSTRACT

Powdered milk was enriched with two different sources of iron: ferrous sulfate and aminoacid chelate iron. Iron sources were added before and after milk drying. 1.5 mg of iron per 100 ml of milk were added to pasteurized milk type C, following a concentration of milk to get a reduction of 50 % from its volume, and drying in spray-dyer. 12 mg of iron were added per 100 g of powdered milk in order to obtain, after milk reconstitution, 1.5 mg of iron per 100 ml of final product that is ready to use, equal to 15 % of the recommended daily intake for children. Physical and chemical characteristics were studied, as well as oxidative stability and bioavailability of sources of iron. Oxidative stability was assessed by the

thiobarbituric acid (TBA) rate. Iron bioavailability was assessed by using an *in vitro* method, based on iron solubility at pH 7,5, after digestion with pepsine. Regarding the way of enrichment, differences were not found. Both technological processes were simple and easy to perform in the laboratory. Differences between the two sources of iron were not found, in terms of physical and chemical characteristics of acidity, humidity, and lipids, proteins, lactose, ash and sediment rates. Oxidative stability of powdered milk was greater when aminoacid chelate iron was used and both sources differed from the control. Aminoacid chelate iron showed greater bioavailability *in vitro* (31,81 %) than ferrous sulfate (17,41 %). The bioavailability deduced *in vivo*, was 15,45 % for aminoacid chelate iron and 8,66 % for ferrous sulfate. Aminoacid chelate iron revealed better oxidative stability and better bioavailability compared to ferrous sulfate, being a good source to enrich powdered milk.

#### 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, L.H. e WOOD, R.J. Calcium e phosphorus. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A., SHIKE, M. Modern nutrition in health and disease. 8 ed. Philadelphia, Lea e Febiger, 1994. v. 1, cap. 7, p. 144 –163.
- BEARD, J., PIÑERO, D. Deficiencia de hierro y desarrollo neural: metabolismo del hierro en el cerebro. *Dieta e salud*, ano 5, n. 3, 1998, disponível em <<http://www.kelloggs-nutricion.com>>, acessado em 08 abr. 2004.
- BRASIL. Resolução - RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002. Regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>, acessado em 08 abr. 2004.
- BRASIL. Resolução – RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. Regolamento Técnico Sobre a Ingestão Diária (IDR) de Proteínas, Vitaminas e Minerais. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, disponível em <http://www.anvisa.gov.br>, acessado em 09 mar. 2006.
- BRASIL. Portaria nº 710 de 10 de junho de 1999. Política Nacional de Alimentação. *Ministério da Saúde*, disponível em <http://www.anvisa.gov.br>, acessado em 09 mar. 2006.
- BRASIL. Portaria nº 369 de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*, disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>, acessado em 25 out. 2004.
- BRASIL. Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>, acessado em 08 abr. 2004.
- BRASIL. Lei nº 6150 . Obrigatoriedade da Iodação do Sal e seu Controle pelos Órgãos Sanitários. D. O. U. Brasília, 04/12/1974.a
- BRASIL. Lei nº 9005. Obrigatoriedade da Adição de Iodo no Sal de Alimentação Humana. D. O. U. Brasília, 17/03/1995.
- .BRIGIDE, P. Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) irradiados. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2002. (Tese de mestrado)
- BUONGERMINO SOUZA, S., CORNBLUTH SZARFAC, S. PACHECO SOUZA, J.M. Anemia no primeiro ano de vida em relação ao aleitamento materno. *Revista Saúde Pública*, vol. 31, n.1, p.15-20, fev. 1997.
- CARDOSO, M.A., FERREIRA, M.U., CAMARGO, L.M.A., SZARFARC, S.C. Anemia em população de área endêmica de malária, Rondônia (Brasil). *Revista Saúde Pública*, vol. 26, n.3, p.161-166, jun. 1992.
- CARDOSO, M.A., PENTEADO, M.V.C. Intervenções nutricionais na anemia ferropriva. *Caderno de Saúde Pública*, vol. 10, n.2, p.231-240, abr./jun. 1994.
- CINTRA, I.P., OLIVEIRA, C.L., VELLOZO, E.P., FAGIOLI, D., SILVA, R., AIRES, A.P., FISBERG, M. Utilização de leite fortificado com ferro na merenda escolar do município de São Paulo. *Pediatria Moderna*, vol. 38, n.10, p.475-479, out. 2002.
- CLAUD, M.V., FREITAS, O. Compostos alternativos para o tratamento e/ou prevenção da anemia ferropriva. *Caderno de Nutrição*, vol.8, p.1-9, 1994.
- CORNBLUTH SZARFAC S., CASSANA, L.M.N., FUJIMORI, E., GUERRA-SHINOHARA, E.M., OLIVEIRA, M.V. Relative effectiveness of iron

bis-glycinate chelate (Ferrochel) and ferrous sulfate in the control of iron deficiency in pregnant women. **ALAN - Archivos Latinoamericanos de nutricion**, vol.51, n.1, supl.1., p.42-47, mar.2001.

DIAZ A., M.S., GUERRA H., P., CAMPOS S., M.S., LETELIER C., M.A., OLIVARES G., M. Prevalencia de deficiencia de hierro en preescolares de la comuna La Pintana. **Revista Chilena de Nutricion**, vol.29, n.1, p.10-13, abr. 2002.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo, Atheneu, 1998, 652p.

FAIRWEATHER-TAIT, S. Iron biochemistry. In: **Iron: nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.1-2, 1995a.

FAIRWEATHER-TAIT, S. Iron absorption. In: **Iron: nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.3-12, 1995b.

FRAGA, C.G., OTEIZA, P.I. Iron toxicity and antioxidant nutrients. **Toxicology**, vol.180, 2002, p. 23-32.

GAUCHERON, F. Iron fortification in dairy industry. **Food Science and Technology**, vol.11, p.403-409, 2000.

GOMES, J.C., SILVA, M.H.L., SILVA, C.O. **Análise de alimentos**. Viçosa, Funarbe, 2003, 154p.

HEDLER, M.C.C.M., JULIANO, Y. E SIGULEM, D.M. Anemia in infancy: etiology and prevalence. **Jornal de Pediatria**, vol. 78, n.4, p.321-326, jun. 2002.

HEIMBACK, J., RIETH, S., MOHAMEDSHAH, F., SLESINSKI, R., SAMUEL-FERNANDO, P., SHEEHAN, T., DICKMANN, R., BORZELLECA, J. Safety assesment of iron EDTA [Sodium Iron (Fe <sup>3+</sup>) Ethylenediaminetetraacetic Acid]: summary of toxicological, fortification and exposure data. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 38, p.99-111, 2000.

HORTON, S., ROSS, J. The economics of iron deficiency. **Food policy**, vol.28, p.51-75, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1985, 533p.

KORLOKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara, 1988, 783p.

LEONG, W.I., BOWLUS, C.L., TALLKVIST, J., LÖNNERDAL, B. Iron supplementation during infancy - effects on expression of iron transporters, iron absorption, and iron utilization in rat pups. **American Journal Of Clinical Nutrition**, vol178, p.1203-1211, 2003.

LEVY-COSTA, R.B., MONTEIRO, C.A. Consumo de leite de vaca e anemia na infância no município de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, vol.38, n.6, p.797-803, 2004.

LIMA, A.V.M.S., LIRA, P.I.C., ROMANI, S.A.M., et al. Determinant factors of hemoglobin levels in 12 months old infants in the South of the Zona da Mata of Pernambuco. **Revista de Saúde Materno Infantil**, vol. 4, n.1, p.35-43, jan./mar. 2004.

LOPES, M.C.S., FERREIRA, L.O.C., FILHO, M.B. Uso diário e semanal de sulfato ferroso no tratamento de anemias em mulheres no período reprodutivo. **Cadernos de Saúde Pública**, vol.15, n.4, p. 799-808, oct./dec.1999.

MACHADO, R.M.G., FREIRE, V.H., SILVA, P.C., FIGUERÊDO, D.V., FERREIRA, P.E. **Controle ambiental em pequenas e médias industrias de laticínios**. Belo Horizonte, Segrac, 2002, 224p.

MACPHAIL, A.P. Iron deficiency and the developing world. **ALAN - Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, vol.51, n.1, supl.1., p.2-6, mar.2001.

MAHAN, L.K., ARLIN, M.T. **Krause - Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9<sup>a</sup> ed. São Paulo, Roca, 1179p.

MANGUEIRA, T.F.B., TRAVASSOS, A.E.R., FIOREZE, R. et al. Addition of iron to the milk and its retention in the curd. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, vol. 22, n.3, p.305-307, sept./dec. 2002.

MARCHI, R.P., SZARFARC, S.C., RODRIGUES, J.G., MORIMOTO, J.M. Consumo de arroz fortificado com ferro no controle da anemia. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN**, 7, Belo Horizonte, Anais, p.101, 2003.

MARTINI, F.C.C. Comparação entre a

disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. (Tese de mestrado)

MIGLIORANZA, L.H.S., MATSUO, T., CABALLERO-CÓRDOBA, G.M., DICHI, J.B., CYRINO, E.S., OLIVEIRA, I.B.N., MARTINS, M.S., POLEZER, N.M., DICHI, I. Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina, Paraná, Brazil. **Nutriton**, vol.19, n.5, p.419-421, 2003.

MIRANDA, A.S., FRANCESCHINI, S.C.C., PRIORE, S.E., EUCLYDES, M.P., ARAÚJO, R.M.A., RIBEIRO, S.M.R., NETTO, M.P., FONSECA, M.M., ROCHA, D.S., SILVA, D.G., LIMA, N.M.M., MAFFIA, U.C.C. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com idade de 12 a 60 meses do município de Viçosa, MG. **Revista de Nutrição**, vol. 16, n.2, p.163-169, abr./jun. 2003.

MIRANDA, L.S. Enriquecimento de alimento à base de leite em pó e fubá de milho com ferro. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1999. (Tese de mestrado)

MONTEIRO, C.A., SZARFAC, S.C. e MONDINI, L. Tendência secular de anemia na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista Saúde Pública**, vol. 34, n.6, supl, p.62-72, dez. 2000

MUSLIMATUM, S. Nutrition of Indonesian women during pregnancy and lactation: a focus on vitamin A and iron. Indonésia, Wageningen Universiteit, 2001. (Tese de doutorado)

NAME, J.J. e GUERRA, J.E.F. Uma revisão crítica sobre alimentos fortificados com ferro. **Food Ingredients**, ano 2, n.12, p.56-61, maio/jun. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Food and Nutrition Board. **Recommended dietary allowances**. 10<sup>th</sup>ed. Washington, National Academic Press, 1989, 284p.

NAYAK, B., NAIR, K.M. In vitro bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. **Food Chemistry**, vol.810, p. 545-550, 2003.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger - Princípios de bioquímica**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo, Editora Metha, 2002, 975p.

NELSON, M. Iron and cancer. In: **Iron: Nutritional and physiological significance**. London, Chapman & Hall, p.88-92, 1995.

NEUMAN, N.A., TANAKA, O.Y., SZARFAC, S.C. et al. Prevalência e fatores de risco para anemia no Sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**, vol. 34, n.1, p.56-63, fev. 2000.

OLIVARES G., M., WALTER K., T. Consecuencias de la deficiencia de hierro. **Revista Chilena de Nutrición**, vol.30, n.3, p.226-233, dic. 2003.

OLIVARES, M., PIZARRO F., PINEDA, O., NAMEM J.J., HERTRAMPF, E., WALTER, T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. **Journal Nutrition**, vol.127, p.1407-1411, 1997.

OSMAN, A.K., AL-OTHAIMEEN, A. Experience with ferrous bis-glycine chelate as an iron fortificant in milk. **International Journal Nutrition Research**, vol. 72, n.4, p. 257-263, 2002.

PASSMORE, R., NICOL, B.M. e NARAYANA RAO, M. **Manual das necessidades nutricionais humanas**. São Paulo, Livraria Atheneu, 1986, 73p.

PINEDA, O., ASHMEAD, H. D., PEREZ, J.M., LEMUS, C.P. Effectiveness of iron amino acid chelate on the treatment of iron deficiency anemia in adolescents. **Journal of Applied Nutrition**, vol. 46, n.1 e 2, p.2-13, 1994.

RAO, B.S.N., PRABHAVATHI, T. An in vitro method for predicting the bioavailability of iron from foods. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol.31, p.169-175, 1978.

RIOS L., E., VEGA B., V., CHADUD M., P., ROMERO D., G. Prevención de deficiencia de hierro em lactantes de baixo peso de nacimiento: comparación de dos métodos de administrar hierro. **Revista Chilena de Pediatría**, vol. 70, n.5, p. 384-389, set. 1999.

SAKAMOTO, L.M. Estudo comparativo entre os aumentos das ferremias, determinados sem administração prévia de ferro; após as administrações de sulfato ferroso e complexo ferro-peptídeo. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003. (Tese de doutorado)

SCHLIMME, E., BUCHHEIM, W. **La leche y sus componentes**. Zaragoza, Acribia, 2002, 121p.

SILVA, D.G. Fatores de risco para anemia ferropriva em lactentes do município de Viçosa, Minas Gerais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2003. (Tese de mestrado)

SILVA, M.R., CASTRO, T.G., COSTA, N.M.B., FERREIRA, C.L.L.F., FRANCESCHINI, S.C.C., LEAL, P.F.G., REIS, F.P. The effect of a fermented iron-fortified milky drink on the nutritional status of pre-school children in Viçosa - MG. *Nutrire: revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, vol.23, p.23-32, jun. 2002.

SILVA, P.H.F., PEREIRA, D.B.C., OLIVEIRA, L.L., COSTA JÚNIOR, L.C.G. *Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos*. Juiz de Fora, Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997, 190p.

SILVA, P. *Farmacologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1994, 1450p.

SIMÕES, M.C.C., MOURA, E.C.M., SGARBIERI, V.C., FIGUEIREDO, D.B. Avaliação do impacto de um suplemento nutricional rico em ferro hematínico. *Cadernos de Saúde Pública*, vol.15, n.4, p.871-881, oct./dec. 1999.

SOARES, N.T., GUIMARARES, A.R.P., SAMPAIO, H.A.C. et al. Estado nutricional de lactentes em áreas periféricas de Fortaleza. *Revista de Nutrição*, vol. 13, n.2, p.99-106, maio/ago. 2000.

SOGLIA, S.L.O. Enriquecimento de leite tipo C com ferro aminoácido quelato: biodisponibilidade e características físico-químicas e sensoriais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1996. (Tese de mestrado)

SOUZA, A.I., FILHO, M.B. Diagnóstico e tratamento das anemias carenciais na gestação: consensos e controvérsias. *Revista de Saúde Materno Infantil*, vol. 3, p.473-479, n.4, out./dez. 2003.

SOUZA, M.C.B. Importância da alimentação nas creches e sua contribuição à economia familiar. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1998. (Tese de mestrado)

STEKEL, A., OLIVARES, M., PIZARRO, F., CHADUD, P., LOPEZ, I., AMAR, M. Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol.43, p.917-922, 1986.

THURNHAM, D. Iron as a pro-oxidant. In: *Iron: Nutritional and physiological significance*. London, Chapman & Hall, p.33-41, 1995.

TORRES, M.A.A., LOBO, N.F., SATO, K., QUEIROZ, S.S. Fortificação do leite fluido na prevenção e tratamento da anemia carencial ferropriva em crianças menores de 4 anos. *Revista de Saúde Pública*, vol.30, n.4, p.350-357, ago. 1996.

TORRES, M.A.A., SATO, K., LOBO, N.F., QUEIROZ, S.S. Efeito do uso de leite fortificado com ferro e vitamina C sobre os níveis de hemoglobina e condição nutricional de crianças menores de 2 anos. *Revista de Saúde Pública*, vol.29, n.4, p.301-307, ago. 1995.

TORRES, M.A.A., SATO, K., JULIANO, Y., QUEIROZ, S.S. Terapêutica com doses profiláticas de sulfato ferroso como medida de intervenção no combate à carência de ferro em crianças atendidas em unidades básicas de saúde. *Revista de Saúde Pública*, vol.28, n.6, p.410-415, dez. 1994.

TUMA, R.B., YUYAMA, L.K.O., AGUIAR, J.P.L., MARQUES, H.O.. Impacto da farinha de mandioca fortificada com ferro aminoácido quelato ao nível de hemoglobina de pré-escolares. *Revista de Nutrição*, vol. 16, n.1, p.29-39, jan./mar. 2003.

UCHIMURA, T.T., SZARFAC, S.C., LACTORRE, M.R.D.O. et al. Anemia e peso ao nascer. *Revista Saúde Pública*, vol. 37, n.4, p.397-403, ago. 2003.

WARD R. Iron overload and toxicity. In: *Iron: Nutritional and physiological significance*. London, Chapman & Hall, p.50-53, 1995.

YBARRA, L.M., COSTA, N.M.B., FERREIRA, C.L.L.F. Calcium and iron interaction: a review. *Journal of Brazilian Society of Food Nutrition*, v.22, p.85-107, 2001.

## APLICAÇÃO DO MODELO DE SOLUBILIDADE IDEAL A DADOS EXPERIMENTAIS DE SOLUÇÕES DE LACTOSE EM ÁGUA

Ítalo Tuler Perrone<sup>1</sup>  
Fabiana Queiroz Ferrua<sup>2</sup>

### RESUMO

Este trabalho possui como objetivo descrever o modelo de solubilidade ideal e aplicá-lo a dados experimentais de soluções de lactose em água. Para tal, serão descritas algumas características da lactose e sua importância, demonstração da equação de solubilidade ideal, dados experimentais e análise dos resultados.

### INTRODUÇÃO

A pouca solubilidade da lactose e a sua capacidade de formar soluções supersaturadas são importantes sob o ponto de vista tecnológico, influenciando no rendimento industrial deste açúcar que utiliza como matéria prima o soro de queijo, no tipo de cristal formado e na sua tendência a cristalização em vários produtos lácteos.

A susceptibilidade a cristalização descontrôlada em produtos lácteos é um dos principais problemas relativos a presença de lactose. A textura arenosa e a formação de depósitos sobre a tampa ou o fundo do recipiente são os fatores que diretamente afetam as características do produto, deprecando-o.

Sabe-se que a textura arenosa no doce de leite em decorrência da cristalização da lactose é um dos principais defeitos quando o produto é estocado por longo tempo ou resfriado lentamente, ou quando se utiliza açúcar em excesso (SOUZA, 1979).

Os cristais tridimensionais de lactose se repetem, existindo em duas formas de cristal, alfa hidratada e beta anidra, que diferem em várias propriedades físicas, entre as quais destaca-se a solubilidade.

A lactose em produtos desidratados pode se encontrar na forma amorfã e este fato implica em pós de baixa qualidade. A lactose amorfã em produtos desidratados implicará em grande absorção de água do ambiente e consequentemente na restrição do emprego deste produto (Robinson, 1986).

A observação do comportamento de soluções possibilitou a execução de uma lei limite

(válida para soluções infinitamente diluídas ou soluções que tendam a isso). O modelo adotado para a construção da lei limite considera uma solução composta de um solvente volátil e de um ou mais solutos não voláteis. Se um líquido puro for introduzido, a temperatura constante, em um recipiente previamente evacuado, uma parte deste líquido irá vaporizar-se, preenchendo o espaço existente acima da superfície do líquido com o vapor. Após o equilíbrio ter sido alcançado definimos que a pressão de vapor do líquido puro é  $p_0$ . Experimentalmente observa-se que a dissolução de uma substância não volátil no líquido implica em pressão de vapor acima da solução, no equilíbrio, menor do que aquela do líquido puro. Sendo o soluto não volátil, o vapor consiste de solvente puro. Ocorre diminuição de pressão na fase de vapor ao se aumentar o material não volátil.

A equação linear que descreve o comportamento ideal é:

$$p = p_0 - p_0 X_2 = p_0(1 - X_2)$$

Onde  $X_2$  é a fração molar do soluto na solução e é igual a  $1-X$  ( $X$  é a fração molar do solvente na solução). Desta forma temos que  $X + X_2 = 1$  e a equação torna-se:

$$p = p_0 X$$

A equação final acima é a lei de Raoult. Esta lei estabelece que a pressão de vapor do solvente sobre uma solução é igual à pressão de vapor do solvente puro multiplicada pela fração molar do solvente na solução. As soluções reais seguem mais de perto a lei de Raoult, à medida que estão mais diluídas. A solução ideal é definida como sendo aquela que obedece a lei de Raoult em todo o intervalo de concentrações.

1 Mestre em Ciência dos Alimentos. Pesquisador e Professor da EPAMIG/CT/ILCT. Rua Tenente Freitas, 116, Juiz de Fora - MG. Tel: 32-32243116. E-mail: italo.perrone@epamig.br

2 Doutora Engenharia de Alimentos. Pesquisadora e Professora da Universidade Federal de Lavras. Campus Universitário - Lavras MG. Tel: 35-38291404. E-mail: fqferrua@ufla.br

Como uma generalização do comportamento das soluções reais, a solução ideal segue a lei de Raoult em todo o intervalo de concentrações. Essa definição associada com a condição geral de equilíbrio conduz a uma expressão analítica do potencial químico do solvente em uma solução ideal. Se a solução estiver em equilíbrio com o seu vapor, uma consequência da segunda lei da termodinâmica é que os potenciais químicos do solvente na solução e no vapor sejam iguais:

$$\mu_{\text{líquido}} = \mu_{\text{vapor}}$$

onde  $\mu_{\text{líquido}}$  é o potencial químico do solvente na fase líquida e  $m_{\text{vapor}}$  é o potencial químico do solvente no vapor. Sabendo que o vapor é solvente puro sob uma pressão  $p$  e considerando-o como um gás ideal temos que a expressão de  $m_{\text{vapor}}$  é dada por:

$$\mu_{\text{vapor}} = \mu^{\circ}_{\text{vapor}} + RT \ln p$$

E assim é correto afirmar que:

$$\mu_{\text{líquido}} = \mu^{\circ}_{\text{vapor}} + RT \ln p$$

Introduzindo nessa equação a lei de Raoult e desenvolvendo o logaritmo, obtemos:

$$\mu_{\text{líquido}} = \mu^{\circ}_{\text{vapor}} + RT \ln p^{\circ} + RT \ln X$$

Fazendo  $X=1$ , ou seja, considerando que o solvente puro está em equilíbrio com o vapor, a pressão será  $p^{\circ}$  e a condição de equilíbrio se torna:

$$\mu_{\text{líquido}} = \mu^{\circ}_{\text{vapor}} + RT \ln p^{\circ}$$

Subtraindo esta equação da equação precedente, obtemos:

$$\mu_{\text{líquido}} - \mu^{\circ}_{\text{líquido}} = RT \ln X$$

Omitindo o índice líquido fica:

$$\mu = \mu^{\circ} + RT \ln X$$

Temos que  $m$  é o potencial químico do solvente na solução e  $m^{\circ}$  é o potencial químico do solvente líquido puro.

O equilíbrio entre o soluto na solução e o soluto sólido puro será demonstrado abaixo. Nesta condição a solução se encontra saturada em relação ao soluto. A condição de equilíbrio é que o potencial químico do soluto seja o mesmo em ambas as fases, isto é,

$$\mu(T, p, x) = \mu(\text{sólido})(T, p)$$

Sabendo que  $\mu_2(T, p, x) = \mu^{\circ}(T, p) + RT \ln X$  e assim:

$$\mu^{\circ}(T, p) + RT \ln X = \mu(\text{sólido})(T, p)$$

Recompondo temos:

$$\ln X = [-\mu^{\circ}(T, p) - \mu(\text{sólido})(T, p)] / RT$$

Como  $\mu^{\circ}$  é o potencial químico do líquido puro,  $\mu^{\circ}(T, p) - \mu_2(\text{sólido})(T, p) = \Delta G_{\text{fusão}}$  é a energia de Gibbs de fusão molar do soluto puro na temperatura  $T$ . E assim podemos escrever:

$$\ln X = -\Delta G_{\text{fusão}} / RT$$

Pode-se descrever a dependência de  $T$  com  $X$  ao se calcular  $(\partial T / \partial X)p$ . Derivando a equação acima temos:

$$1/X = -1/R[\partial(\Delta G_{\text{fusão}}/T)/\partial T]p (\partial T / \partial X)p$$

Mediante a equação de Gibbs-Helmholtz,

$$[\partial(\Delta G/T)/\partial T]p = -\Delta H/T^2, \text{ chega-se a:}$$

$$1/X = \Delta H_{\text{fusão}}/RT^2 (\partial T / \partial X)p$$

Na equação acima  $\Delta H_{\text{fusão}}$  é o calor de fusão do soluto puro a temperatura  $T$ . Escrevendo a equação acima na forma diferencial e procedendo a integração temos:

$$dx/x = \Delta H_{\text{fusão}}/RT^2 dT$$

Integrando a equação acima nos dois lados temos:

$$\ln X = -\Delta H_{\text{fusão}}/R (1/T - 1/T_0)$$

A equação acima exprime a lei da solubilidade ideal. De acordo com esta lei, a solubilidade de uma substância é a mesma em todos os solventes com as quais forma uma solução ideal. A solubilidade de uma substância em uma solução ideal depende somente das propriedades dessa substância. O ponto de fusão  $T_0$  e o calor latente de fusão baixos favorecem um aumento da solubilidade. Durante o processo de integração considera-se que o  $\Delta H_{\text{fusão}}$  independe da temperatura, porém deve-se empregar temperaturas próximas ao ponto de fusão do sólido, já que nessas condições a aproximação empregada é válida.

A solubilidade varia consideravelmente de substâncias para substância, sendo que algumas são capazes de gerar soluções altamente concentradas, como a lactose, e outras não possuem esta capacidade. A natureza química da molécula é determinante nesta propriedade e características como momento de dipolo, tamanho, distribuição eletrônica e tipo de ligação química se enquadram neste contexto.

As forças intermoleculares que ocorrem entre o soluto e o solvente são fundamentais para o processo de solubilidade e indicam que sem efeitos químicos específicos as forças intermoleculares entre espécies quimicamente semelhantes levam a uma menor entalpia endotérmica da solução do que espécies de natureza contrária. Em alguns casos, a solubilidade não depende somente do coeficiente de atividade do soluto (que é uma função das forças intermoleculares entre o soluto e o solvente), mas também da fugacidade do estado padrão no qual o coeficiente de atividade se refere e da fugacidade do sólido puro.

Como já foi adotado acima o subscrito 2 se refere ao soluto e temos que a equação de equilíbrio é:

$$f_{2(\text{sólido puro})} = f_{2(\text{sólido na solução})}$$

Ou podemos reescrever a equação acima como:

$$X_2 = f_{2(\text{sólido puro})}/\gamma_2 f_2^0$$

Onde  $X_2$  é a solubilidade (fração molar do soluto) do sólido no solvente,  $\gamma_2$  é o coeficiente de atividade da fase líquida e  $f_2^0$  é a fugacidade do estado padrão para o qual  $\gamma_2$  se refere. Quando a natureza química do soluto e do solvente é semelhante pode-se considerar que  $\gamma_2=1$ .

## METODOLOGIA

O emprego do modelo de solubilidade ideal é recomendado para soluções infinitamente diluídas nas quais o vapor de soluto que está em equilíbrio com a solução se comporta como um gás ideal. Soluções de lactose podem se tornar supersaturadas sem o aparecimento de cristais. Em uma solução de lactose em água existe um equilíbrio mutarrotacional entre alfa lactose e beta lactose, sendo a primeira significativamente menos solúvel que a última. Desta forma, os cristais formados neste tipo de solução são predominantemente de alfa lactose e quando parte deste açúcar cristaliza uma parte proporcional de beta lactose se transforma em alfa lactose para que o equilíbrio mutarrotacional seja mantido. No desenvolvimento abaixo consideraremos que exista somente alfa lactose em solução para que se possa comparar os valores experimentais com os valores previstos pela teoria.

Considerando o modelo de solubilidade ideal,  $R=8,31441 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ,  $K=273,15 + T^\circ\text{C}$ ,  $H_{\text{fus}} (\text{J/mol})$  da alfa lactose e o ponto de fusão da mesma temos que:

- A temperatura de  $10^\circ\text{C}$  a fração molar do soluto pode ser calculada através de:

$$\ln X_2 = -41724/8,31441 (1/283,15 - 1/489,15) \Rightarrow X_2 = 0,00057$$

- A temperatura de  $20^\circ\text{C}$  a fração molar é:

$$\ln X_2 = -41724/8,31441 (1/293,15 - 1/489,15)$$

$$\Rightarrow X_2 = 0,00105$$

- A temperatura de  $30^\circ\text{C}$  a fração molar é:

$$\ln X_2 = -41724/8,31441 (1/303,15 - 1/489,15)$$

$$\Rightarrow X_2 = 0,00185$$

- A temperatura de  $40^\circ\text{C}$  a fração molar é:

$$\ln X_2 = -41724/8,31441 (1/313,15 - 1/489,15)$$

$$\Rightarrow X_2 = 0,00313$$

- A temperatura de  $50^\circ\text{C}$  a fração molar é:

$$\ln X_2 = -41724/8,31441 (1/323,15 - 1/489,15)$$

$$\Rightarrow X_2 = 0,00514$$

Considerando a equação para a solubilidade ideal  $\ln X_2 = -\Delta H_{\text{fusão}}/R (1/T - 1/T_0)$  podemos escrever:

$$\ln X_2 = -\Delta H_{\text{fusão}}/RT_0 + DH_{\text{fusão}}/RT$$

Esta equação é a equação de uma reta ao se considerar  $\ln X_2$  como a variável independente e  $1/T$  como a variável dependente. Empregando os valores experimentais tabelados abaixo se pode calcular qual deveria ser o valor  $\Delta H_{\text{fusão}}$  e de  $T_0$  (temperatura de fusão) para a lactose caso o modelo ideal descreve-se perfeitamente o comportamento experimental.

Os valores encontrados após a regressão linear mostram que o coeficiente angular é 0,00167 e o valor do coeficiente linear é 0,000383035. Comparando com a equação inicial temos que:

$$-0,00167 = \Delta H_{\text{fusão}}/R \text{ (i)}$$

$$-0,000383035 = DH_{\text{fusão}}/RT_0 \text{ (ii)}$$

Substituindo a equação (i) na equação (ii) pode-se determinar o valor de  $T_0$  que é 4,366 K.

**Tabela 1** - Solubilidade da lactose em solução, segundo Montes 2003

Gramas de lactose/100g de água	Temperatura 10°C	Temperatura 20°C	Temperatura 30°C	Temperatura 40°C	Temperatura 50°C
14,612	22,860	25,890	34,689	48,770	

**Tabela 2** - Solubilidade versus concentração molar

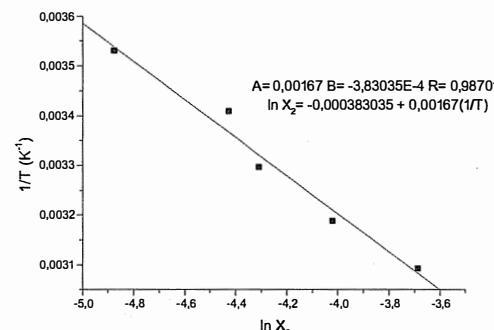
Temperatura	Fração molar da lactose	Fração molar da água
10°C	0,0076	0,9924
20°C	0,0119	0,9881
30°C	0,0134	0,9866
40°C	0,0179	0,9821
50°C	0,0250	0,9750

**Tabela 3** - Propriedades físicas da lactose, segundo Breche, Fanni e Parmentier 1999

Tipo de lactose	$\Delta H_{\text{fus}}$ (J/g)	$\Delta H_{\text{fus}}$ (J/mol)	To ponto de fusão
Alfa lactose	122	41724	216
Beta lactose	198	67716	225
Alfa lactose hidratada	134	48240	215

**Tabela 1 - Dados de solubilidade**

Fração molar de lactose real ( $X_2$ )	$\ln X_2$	Temperatura (K)	$1/T (K^{-1})$
0,0076	-4,879607	283,15	0,00353170
0,0119	-4,431217	293,15	0,00341122
0,0134	-4,312501	303,15	0,00329870
0,0179	-4,022955	313,15	0,00319336
0,0250	-3,688879	323,15	0,00309454



## CONCLUSÃO

O emprego do modelo ideal de solubilidade para soluções de lactose em água não é recomendado, já que foram observados desvios grosseiros entre os dados teóricos e os experimentais. Este resultado enfatiza as diferenças entre as aproximações empregadas para a construção do modelo e as soluções reais de lactose. Durante a demonstração do modelo forma considerados pontos fundamentais que:

- a solução se comportasse idealmente em ampla faixa de temperatura;
- o  $\Delta H_{fusão}$  não variasse com a temperatura, ou em outras palavras que o ponto de fusão da substância ocorresse próximo ao ponto triplo;
- o vapor em equilíbrio com a solução se comportasse como um gás ideal (em um solvente como a água, onde ocorrem muitas ligações de hidrogênio intermoleculares, esta aproximação não é eficiente);
- a solução deveria ser infinitamente diluída (as soluções de lactose podem ser supersaturadas sem estarem cristalizadas);

Pode-se concluir que modelos mais refinados devem ser estudados para a descrição da solubilidade da lactose em água. Para este modelo ser eficiente o mesmo deve contemplar os efeitos de mutarrotação, saturação da solução e desvio da idealidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SOUZA, L.R.P. *Efeito da Acidificação e do Tratamento Térmico do Leite na Qualidade do Doce de Leite*. Viçosa, UFV, 1979. 61p. (Tese M.S.).
- TERÁN-ORTIZ, G.P. *Efeito da Adição de Gomas Xantana e Locusta na Cinética de Inibição de Cristalização de Açúcares em Doce de Leite*. Lavras, UFLA, 1998. 78p. (Tese M.S.).
- BECHE, N.D., FANNI,J., PARMENTIER,M. *Physical and Chemical Properties of Molecular Compounds of Lactose*. Journal of Dairy Science, 82: 2558-2563, 1999.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. Sarvier. Terceira Edição, São Paulo, 2002. 975p.
- MONTES, E.J.M.. Dados de Solubilidade da Lactose em Diferentes Temperaturas. *Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios*. Juiz de Fora, EPAMIG/CEPE/ILCT, 2003. 333-260p.
- ROBINSON, R.K. *Modern Dairy Technology - Advances in Milk Processing*. Elsevier Applied Science Publishers LTD, New York, 1986. 438p.
- KURMANN, J.A.; RASIC, J.Lj.. *Yoghurt Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, 1978. 466p.
- TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K.. *Yoghurt Science and Technology*. Pergamon Press, Oxford, 1985. 431p.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.. *Introdução à Química de Alimentos*. Varela, São Paulo, 1992. 223p.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R.. *Química y Física lactológica*. Acribia, Zaragoza, 1984. 423p.

**gemacom**  
Insumos para indústria de alimentos

**ESTABILIZANTES**  
**EMULSIFICANTES**  
**MISTURAS EM PÓ AROMATIZADAS**  
**AROMAS**  
**CULTURAS LÁTICAS**  
**CORÂNTES**  
**PREPARAÇÕES DE FRUTAS**  
**CONSERVANTES**

Rua Bruno Simili, 380 - Distrito Industrial  
CEP 36092-050 - Juiz de Fora - MG  
Tel. (32)3249-7600 - Fax (32)3249-7610  
[www.gemacom.com.br](http://www.gemacom.com.br)  
[gemacom@gemacom.com.br](mailto:gemacom@gemacom.com.br)

## MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITE

### Psicrotropics Microorganisms in milk

Elisângela Michele Miguel<sup>1</sup>  
Vanessa Aglaê Martins Teodoro<sup>2</sup>  
Eduardo Kenji Nunes Ahashiro<sup>3</sup>

#### RESUMO

A indústria láctea atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura e a qualidade do leite é uma das principais exigências para a obtenção de produtos de qualidade e vida-de-prateleira prolongada.

Atualmente, o resfriamento do leite na fazenda e o transporte a granel são importantes instrumentos que visam à preservação da qualidade microbiológica da matéria-prima e, consequentemente, a diminuição da perecibilidade do produto, tendo em vista que as baixas temperaturas inibem a ação acidificante dos microrganismos mesofílicos. Entretanto, tais temperaturas selecionam os microrganismos psicrotróficos que são capazes de crescer em temperaturas de refrigeração, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento. Estes microrganismos podem produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que provocam alterações no leite e seus derivados, comprometendo sua qualidade e, consequentemente, causam prejuízos à indústria láctica.

**Palavras-chave:** leite, resfriamento, granelização, microrganismos psicrotróficos

#### 1 - INTRODUÇÃO

O leite é um alimento valioso no aspecto nutricional, pois consiste em uma fonte rica de proteínas, gordura, carboidratos, vitaminas e sais minerais. Essas características o fazem um meio de cultura ideal para o crescimento de microrganismos (ALMEIDA *et al.*, 1999).

A produção de leite tem um papel fundamental em todas as economias, especialmente em países em desenvolvimento, porque além de envolver um componente social, o leite é considerado um produto essencial para a população na maioria dos países (ZOCCA e GOMES, 2005).

A granelização trouxe uma melhoria da qualidade do leite recebido pela indústria, pois o armazenamento e transporte do leite refrigerado até a indústria reduzem o problema de proliferação de microrganismos mesófilos que aumentam a acidez do leite, prejudicando seu beneficiamento. Entretanto, com a permanência do leite a temperaturas de refrigeração por períodos prolongados tem sido notada a substituição da microbiota de bactérias deteriorantes mesofílicas por uma microbiota de bactérias psicrotróficas (ALMEIDA, 1999).

A carga microbiológica do leite cru é de extrema importância para qualidade final de

produtos lácteos. Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, devido à sua contaminação principalmente pelas bactérias psicrotróficas formadoras ou não de esporos que, apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas que rapidamente alteram o produto (BISHOP e WHITE, 1988; BOOR *et al.*, 1998; BURDOVÁ *et al.*, 2002).

No Brasil, o leite *in natura* apresenta baixa qualidade e este fator está relacionado com a influência das estações do ano, as práticas de produção e o manuseio na fazenda, a temperatura de permanência do leite e a distância do transporte entre a fazenda e a plataforma de recepção da indústria, que contribuem para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes do leite (HUHN *et al.*, 1980).

A microbiota do leite, imediatamente após a produção, reflete diretamente a contaminação microbiana que ocorreu nesta fase. O tipo e freqüência de microrganismos no leite cru são determinados pelas condições de higiene na produção, pelo tempo e pela temperatura de estocagem e armazenamento (COUSIN, 1982).

A adoção da prática de estocagem sob refrigeração na fonte de produção praticamente elimina a deterioração do leite por bactérias

mesofílicas (COUSIN, 1982; FAIRBAIRN e LAW, 1986). Entretanto, a manutenção do leite cru em temperaturas de refrigeração pode ocasionar problemas tecnológicos associados à seleção de bactérias psicrotróficas. Uma importante característica dos psicrotróficos comumente encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de multiplicar a 7°C ou menos, independentemente da sua temperatura ótima de crescimento (COUSIN, 1982; CELESTINO *et al.*, 1997; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

#### 2 - ORIGEM DE MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITE

A presença de microrganismos psicrotróficos está relacionada diretamente com as condições de higiene durante a produção; portanto, o leite produzido sob boas práticas e de animais saudáveis, normalmente não apresenta alta contagem de psicrotróficos quando refrigerado a temperaturas iguais ou inferiores a 4°C, enquanto que sob condições de higiene não adequadas, o leite apresenta uma alta contagem destes microrganismos (COUSIN, 1982).

Segundo WIDMANN *et al.*, (2000), os microrganismos psicrotróficos contribuem para a deterioração do leite de duas formas: pela produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas que são secretadas no leite cru durante a estocagem, antes do processamento. Essas enzimas são resistentes ao tratamento térmico. A atividade remanescente dessas enzimas pode reduzir a qualidade sensorial e a vida-de-prateleira dos produtos lácteos. Além disso, possíveis contaminações pós-pasteurização por vários tipos de microrganismos, principalmente *Pseudomonas* spp., podem causar a deterioração do leite pasteurizado.

A microbiota psicrotrófica de importância na indústria de laticínios inclui espécies de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp (COUSIN, 1982; RYSER, 1999; PINTO, 2004).

Apesar de não representar mais do que 10% da microbiota do leite recém-ordenhado, *Pseudomonas* constitui o gênero encontrado com maior freqüência no leite e em derivados mantidos sob refrigeração (COUSIN, 1982; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; DOGAN e BOOR, 2003, PINTO, 2004). Esta bactéria é conhecida por secretar proteases extracelulares resistentes aos tratamentos de pasteurização e UHT (GRIFFITHS *et al.*, 1987; KUMURA *et al.*, 1999; RASHID *et al.*, 2001).

ADAMS *et al.* (1975), ao avaliarem as proteases de bactérias psicrotróficas em leite cru, estocado a 4°C, observaram que 70 a 90% eram *Pseudomonas*.

Segundo SØRHAUG e STEPANIAK (1997), o gênero *Pseudomonas* inclui espécies que se caracterizam por apresentar um curto tempo de geração, entre 0 e 7°C. A contaminação dos produtos lácteos por esse microrganismo pode originar-se do suprimento da água de baixa qualidade, de deficiências nos procedimentos de higiene na fonte de produção e, ou, na indústria de laticínios (SOLER *et al.*, 1995). A importância do controle da contaminação dessa bactéria na cadeia produtiva do leite está relacionada ao seu potencial enzimático que pode variar em função da estirpe (DOGAN e BOOR, 2003).

Estudos realizados por KOHLMAN *et al.*, (1991a; 1991b) e por DOGAN e BOOR (2003), revelaram que *Pseudomonas fluorescens* constitui a espécie deterioradora de maior importância por produzir proteases termoestáveis que hidrolisam a caseína e diminuem a produtividade industrial e a qualidade sensorial dos produtos lácteos (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). Além disso, essa estirpe secreta lipases extracelulares que hidrolisam os triglicerídeos do leite transformando-os em ácidos graxos de cadeia curta, o que afeta diretamente a sua vida-de-prateleira (DEETH, 1993).

A manutenção do leite cru refrigerado por períodos maiores, como três a quatro dias antes de ser processado, pode assegurar tempo suficiente para o crescimento de microrganismos como *P. fluorescens* e outros psicrotróficos que podem alcançar populações de  $10^3$  a  $10^6$  UFC/mL (KOHLMANN *et al.*, 1991a; 1991b). Os testes de predição da vida útil de produtos lácteos são baseados na detecção de psicrotróficos Gram-negativos, especialmente *Pseudomonas*, porque essas bactérias são a causa de grandes problemas de conservação desses produtos (WHITE, 1993).

O ambiente também influencia a produção de proteases; a temperatura ótima de crescimento de *Pseudomonas* é de 20°C em pH neutro. Porém, a produção de proteases aumenta, freqüentemente, com a redução da temperatura. Várias espécies de *Pseudomonas*, quando presentes no leite cru, produzem metaloenzimas neutras, extracelulares e termorresistentes, acarretando sérios problemas após o processamento (FAIRBAIRN e LAW, 1986).

#### 3 - MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS TERMODÚRICOS

Os psicrotróficos termodúricos constituem um importante grupo de microrganismos que, apesar de multiplicarem bem à temperatura de refrigeração, podem sobreviver a temperaturas

1 Mestre em Microbiologia Agrícola. Pesquisadora e Professora da EPAMIG/CT/ILCT. Rua Tenente Freitas, 116, Juiz de Fora – MG. Tel: 32-3224-3116. E-mail: elisimicheli@candidotostes.com.br.

2 Mestre em Medicina Veterinária. Pesquisadora e Professora da EPAMIG/CT/ILCT.

3 Médico Veterinário. Pesquisador e Professor da EPAMIG/CT/ILCT.

de pasteurização e produzir enzimas extracelulares termorresistentes e comprometer a qualidade e a vida-de-prateleira do leite pasteurizado e seus derivados (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; MATTA E PUNJ, 1999).

Os psicrotróficos termodúricos são classificados em Gram-positivos formadores ou não de esporos (COUSIN, 1982), sendo que dentre os formadores de esporos, as espécies do gênero *Bacillus* são as de maior predominância. (COLLINS, 1981; COUSIN, 1982; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; BOOR *et al.*, 1998; MATTA E PUNJ, 1999). Ainda que durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos, sendo consideradas enzimas termorresistentes que podem reduzir a qualidade e a vida-de-prateleira do leite tratado termicamente e de outros produtos lácteos fabricados com leite contaminado (SPECK e ADAMS, 1975; FOX, 1981; COUSIN, 1982; FAIRBAIRN e LAW, 1986).

JOHNSTON e BRUCE (1982), ao investigarem a incidência de psicrotróficos termodúricos no leite, observaram que a contagem de esporos em amostras de leite pasteurizado pode ser maior do que em amostras do leite cru em decorrência da contaminação com esporos do equipamento, em virtude das falhas de higienização nas usinas. Segundo esses autores, as bactérias esporogênicas estão presentes em pequeno número quando o leite é ordenhado em boas práticas sanitárias.

Espécies do gênero *Bacillus* podem causar problemas sensoriais no leite UHT, interferindo em sua qualidade durante o armazenamento e, principalmente, pelo desenvolvimento de rancificação e por secretarem proteases, lipases e fosfolipases extracelulares termorresistentes (TORKAR e MATIJASIC, 2003).

#### 4 - PRODUÇÃO DE ENZIMAS E INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DO LEITE E DERIVADOS

As enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicrotróficas podem resultar em vários problemas tecnológicos para a indústria láctica como a instabilidade do leite ao calor, coagulação durante a pasteurização, gelificação do leite UHT, desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis e redução na produção de queijo (COUSIN, 1982; SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; RAYANAL-LJUTOVAC *et al.*, 2005). PINTO (2004) observou que o grau de proteólise em amostras de leite refrigerado com *P. fluorescens* destinado à produção de leite UHT foi dependente da

temperatura, do tempo de estocagem e do número de células.

Segundo (DATTA e DEETH, 2003) a proteólise do leite UHT durante a estocagem à temperatura ambiente é o principal fator limitante que diminui a sua vida-de-prateleira por meio de mudanças em seu *flavor* e textura levando à formação de gel, sendo que as enzimas responsáveis pela proteólise são a proteinase alcalina nativa do leite, a plasmina e proteinase bacteriana extracelular produzida por contaminantes psicrotróficos no leite antes do tratamento térmico. Além disso, essas proteinases reagem de forma diferente com as proteínas do leite e produzem diferentes peptídeos no leite UHT.

A proteólise pode também ser atribuída à atividade de proteases naturais do leite. A ocorrência de proteólise pela atividade de proteases nativas termoestáveis é relacionada principalmente com a atividade da plasmina, uma serina-protease e seu precursor inativo, o plasminogênio (KOHLMANN *et al.*, 1991c; BASTIAN e BROW, 1996). A plasmina e o plasminogênio encontram-se associados às micelas de caseína e às membranas dos glóbulos de gordura (BASTIAN e BROW, 1996).

A atividade de proteases de *Pseudomonas* pode afetar os sistemas plasmina-plasminogênio do leite por promover o rompimento da micela de caseína, o que resulta em liberação da plasmina ligada à caseína ao soro (FAJARDO-LIRA e NIELSEN, 1998). Esse processo pode comprometer de forma negativa o processo de fabricação de queijos, considerando a importância da plasmina no desenvolvimento de características sensoriais no produto, como sabor, odor e textura (FOX, 1989).

Na indústria de queijos, é frequente a ocorrência de problemas de perdas de rendimento em decorrência da atividade de proteases bacterianas sobre a caseína. Além disso, os microrganismos utilizam em seu metabolismo outros componentes do leite, podendo produzir produtos metabólicos que conferem sabores e odores estranhos, assim como enzimas termoestáveis que causam alterações indesejáveis no alimento, além de promoverem a redução do rendimento na fabricação de queijos (HICKS *et al.*, 1982; ELLIS e MARTH, 1984). Estudos realizados por COUSIN (1982), demonstram um aumento considerável de nitrogênio total em soros de leite inoculados com bactérias psicrotróficas, sugerindo que a atividade metabólica dessas bactérias pode afetar o rendimento de queijos.

De acordo com SØRHAUG e STEPANIAK (1997), as alterações orgânica e estruturais em queijos causadas por enzimas proteolíticas de psicrotróficos foram encontradas quando as contagens no leite atingiram  $2 \times 10^6$  a  $5 \times 10^8$  UFC/mL.

As lipases produzidas por psicrotróficos são

absorvidas pelos glóbulos de gordura e ficam retidas na massa do queijo, enquanto que as proteases, solúveis em água, são perdidas no soro. Por isso, as lipases são mais importantes que as proteases, no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos (FOX, 1989).

São consideráveis os prejuízos econômicos para as indústrias de laticínios relacionados ao uso de leite refrigerado com contaminações elevadas de psicrotróficos e consequente redução do rendimento de queijos (HICKS *et al.*, 1986). Portanto, a qualidade do leite cru constitui um dos fatores fundamentais para a obtenção de queijos de boa qualidade.

#### 1 - CONCLUSÃO

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a fazenda é um fator que beneficia toda a cadeia do leite, pois o resfriamento imediato do leite após a ordenha resulta em um impacto positivo sobre a qualidade do leite. Além disso, a refrigeração do leite na própria fazenda apresenta inúmeras vantagens, em especial com relação ao aumento da vida útil e qualidade dos produtos derivados.

Apesar de todas as vantagens que o sistema de granelização proporciona à melhoria da qualidade microbiológica do leite, observa-se que o uso de leite refrigerado propicia também a perda de qualidade e redução da vida-de-prateleira do leite e seus derivados em decorrência do crescimento de microrganismos psicrotróficos que degradam os seus constituintes e afetam suas características físicas, sensoriais e tecnológicas, diminuindo a aptidão do leite para seu processamento e tornando os seus derivados, muitas vezes, inaceitáveis no mercado consumidor.

Como a temperatura de refrigeração adotada no armazenamento do leite não inibe o crescimento de psicrotróficos nem a produção e atividade de enzimas deterioradoras, é imprescindível que se assegure a adoção de boas práticas agrícolas (BPA) e boas práticas de fabricação (BPF) para limitar a contaminação.

A adoção de medidas adequadas de higiene na produção, armazenamento e transporte do leite podem prevenir a contaminação de microrganismos psicrotróficos que representam um grave problema econômico para a indústria de laticínios.

Como a indústria láctea objetiva expandir a produção e aumentar a vida-de-prateleira, a qualidade microbiológica do leite cru é importantíssima a qualidade do produto final.

#### 7 - SUMMARY

The dairy industry crosses a period of intense structural transformations. The milk

quality is one of the main important point to control to obtaining long shelf-life and quality products. Nowadays, the milk cooling on the farm and the granelization are important instruments that seek the quality preservation of the raw material and decrease spoilage. Low temperatures inhibit the acidification of the mesophilic microorganisms. However the use of low temperatures select the psicrotrófics microorganisms group that are capable to grow in cooling temperatures, independently of its better growth temperature. Those microorganisms can produce proteolitics and lipolitics enzymes that are termal resistant and that can change the quality of milk and cause lots to the dairy industry.

**Keywords:** leite, resfriamento, granelização, microrganismos psicrotróficos

#### 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *Journal of Dairy Science*, v. 58, p. 828-835, 1975.

ALMEIDA *et al.* Avaliação da qualidade do leite pasteurizado comercializado em Juiz de Fora. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 54, n. 311, p. 9-13, 1999.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, v. 6, p. 435-437, 1996.

BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. *Journal of Food Protection*, v.52, p.805-807, 1988.

BOOR, K.J., BROW, S. C., MURPHY, KOZLOWSKI, S. M.; BANDLER, D.K. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 1743-1748, 1998.

BURDOVÁ, O., BARANOVÁ, M., LAUKOVÁ, H. R. e ROLA, J. G. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, v. 46, p. 325-329, 2002.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted uht-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of uht milk on its physico-chemical attributes and flavor. *International Dairy Journal*, v. 7, p. 129-140, 1997.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Research*, v. 64, p. 157-160, 1981.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, v.45, p.172-207, 1982.

DATTA, N. e DEETH, H. C. Diagnosing the cause of

proteolysis in UHT milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v.2, n. 2, p.173-1890, 2003.

DEETH, H. C. Lipase activity and its effect on milk quality. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.48, n. 2, p. 96-98, 1993.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.130-138, 2003.

ELLIS, B. R.; MARTH, E. H. Growth of *Pseudomonas* or *Flavobacterium* in milk reduced yield of cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, v. 47, p. 713-716, 1984.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Protease of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, v. 53, p. 139-177, 1986.

FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 901-908, 1998.

FOX, P. F. Heat-induced changes in milk preceding coagulation. *Journal Dairy Science*, v. 64, p. 2127-2137, 1981.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. *Food Microbiology*, v. 4, p. 285-291, 1987.

HICKS, C. L., ALLAUDDIN, M., LANGLOIS, B.E, O LEARY, J. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. *Journal of Food Protection*, v. 45, n.4, p. 331-334, 1982.

HICKS, C.L., ONURAH, C. O'LEARY, J., LANGLOIS, B. E. effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield- a summation. *Journal of Dairy Science*, v. 69, n.3, p. 649-657, 1986.

HUHN, S., HAJDENWRCEL, J. R.; MORARS, J. M.; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. *Revista de Laticínios Cândido Tostes*, v. 35, n. 209, p.3-8, maio/junho, 1980.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *Journal of Dairy Science*, v.74, p. 4125-4136, 1991a.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3275-3283, 1991b.

KOHLMANN, K. L., NIELSEN, S. S., LADISCH, M. R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra-high temperature processed milk. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 1151-1156, 1991c.

KUMURA, H., MURATA, S., HOSHINO, T., MIKAWA, K. e SHIMAZAKI, K. Autolysis of proteinase from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2078-2083, 1999.

JOHNSTON, D. W., BRUCE, J. Incidence of thermoduric psychrotrophic in milk produced in west of Scotland. *Journal of Applied bacteriology*, v. 52, n.3, p. 333-337, 1982.

MATTA, H., PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 52, n. 2, 1999.

PINTO, C. L. O. Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru resfriado granulado usado para produção de leite UHT. Viçosa, Mg: UFV, Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 2004.

RAYNAL- LJUTOVAC, K., GABORIT, P. e LAURET, A. The relationship between criteria of goat milk, its technological proprieties and the quality of the final products. *Small Ruminant research* (in press), 2005.

RASHID N., SHIMADA, Y., EZAKI, S. ATOMI, H. e TADAYUKI, I. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n. 7, p.4064-4069, 2001.

RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. *Michigan Dairy Review*, v. 8, p. 7-9, 1999.

SPECK, M. L.; ADAMS, D. M. Heat resistant proteolytic enzymes from bacterial sources. In: Symposium: impact of heat stable microbial enzymes in food processing. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 787-789, 1975.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v.8, p.35-40, 1997.

SOLER, A. ; PONSELL, C.; PAZ, M. D.; NUÑEZ. The microbiological quality of milk produced in the Balearic Islands. *International Dairy Journal*, v. 5, p. 69-74, 1995.

TORKAR, K. G. e MATIJASIC, B.B. Partial characterization of bacteriocins produced by *Bacillus cereus* isolates from milk products. *Milk, Food Techol. Biotechnol*, v. 47, n. 2, p. 121-129, 2003.

ZOCCA, R. E Gomes, A. T. Tendências da produção de leite no Brasil. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes - Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios*, n. 345, Julho/Agosto de 2005, p. 74-77, 2005.

WHITE, C.H. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.3126-3132, 1993.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S.S.; RALYEA, R.; BOOR, J.K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.2085-2095, 2000.

# Kilo<sup>®</sup>-L

## O Higienizante Nobre dos Laticínios e das Fazendas

**Tecnologia  
100% brasileira**  
SENDO EXPORTADA PARA O PRIMEIRO MUNDO.



## Conheça as vantagens do higienizante Kilol<sup>®</sup>-L:

- Produto atóxico;
- Não corrosivo;
- Não volátil;
- Não irritante;
- Ecologicamente correto;
- Biodegradável;
- Não contaminante;
- Alto poder antioxidantante.

## Possui também:

- Excelente ação microbiostática (Fungos e bactérias)
- Ação prolongada (Além do tempo de ação dos desinfetantes tradicionais)

Coadjuvante na sanitização ambiental de salas, equipamentos e locais onde são processados o leite e seus derivados como queijos, manteigas, iogurtes, entre outros.

Televendas: (12) 3933-0400

quinabral@quinabral.com.br  
www.quinabral.com.br



**Quinabral**  
Qualidade em benefício da natureza

# COMPILAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA PESQUISA DE FRAUDES EM LEITE - PARTE I

## Compilation of analytical methods in detecting adulterations in milk - Part I

Danielle Braga Chelini Pereira<sup>1</sup>

### RESUMO

Ao leite, assim como a outros produtos alimentares relevantes à dieta humana, pretende-se associar uma imagem positiva como produto nobre, de valor nutritivo expressivo, especialmente no que tange ao fornecimento de proteínas e cálcio. É imprescindível, porém, vincular o produto da mesma forma a conceitos de pureza e integridade. A Legislação Brasileira estabelece que o leite deva estar isento de qualquer tipo de impurezas ou elementos estranhos, bem como que deve permitir o desenvolvimento de flora láctica. Para municiar indústrias, órgãos de fiscalização e controle, laboratórios de prestação de serviços e demais interessados com ferramentas analíticas disponíveis para detecção de substâncias adicionadas de forma fraudulenta ao leite, compilam-se a seguir metodologias descritas por diferentes fontes bibliográficas.

### INTRODUÇÃO

Com o intuito de facilitar o entendimento e acesso às metodologias, estas se encontram agrupadas de acordo com o principal objetivo de sua adição ao leite, qual seja:

- 1- Reconstituintes: substâncias adicionadas com o intuito de recompor ou manter a composição do leite cujo volume foi aumentado fraudulentamente, incluindo amiláceos, cloretos, açúcares e soro de queijo;
- 2- Conservantes: substâncias que reduzem a atividade microbiana, com objetivo de evitar que alterações devidas à atividade de microrganismos possam ser detectadas pelos métodos empregados em controle de qualidade da matéria-prima;
- 3- Neutralizadores: substâncias empregadas para redução da acidez do leite, por neutralização de compostos ácidos provenientes de ação microbiana.

Ressalta-se que as metodologias descritas a seguir, bem como quaisquer outras com objetivos semelhantes, podem e devem ser empregadas em rotinas analíticas de controle de qualidade para detecção e comprovação de adulterações, quando for o caso, contribuindo para reduzir a incidência

destas ações. A qualidade do leite deve ser aprimorada e mantida empregando alternativas tecnológicas adequadas à sua produção higiênica, ao controle sanitário do rebanho, ao transporte e distribuição ágeis do produto e ao seu processamento eficaz e realizado no menor período possível, atendidas as necessidades sociais, industriais e comerciais envolvidas. Somente com o comprometimento de todos os segmentos será possível manter o leite em evidência como alimento de boa qualidade, puro e saudável, o que fortalece o setor integralmente.

Recomenda-se a execução de provas testemunhas positivas e negativas, especialmente para metodologias não realizadas em rotina ou em etapas de treinamento/implantação. É muito importante, no entanto, organizar a execução prática de forma a evitar contaminações ou dúvidas que comprometam a confiabilidade dos resultados.

A escolha por uma ou outra metodologia entre as disponíveis deve considerar a firmeza do analista em sua execução e interpretação de resultados, além da sensibilidade, custo, rapidez, disponibilidade de materiais e reagentes, comuns neste tipo de decisão. Uma vez que em sua maioria são métodos de execução simples, sugere-se que sejam empregados rotineiramente, para análises completas em caso de avaliação ou suspeita de fraude ou em roteiros analíticos periódicos para todos os fornecedores da indústria.

<sup>1</sup> Professora/pesquisadora EPAMIG/CT/ILCT. danielle@epamig.br. R. Tenente Luiz de Freitas, 116 – Santa Terezinha. Juiz de Fora-MG. (32) 3224 3116.

### MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE RECONSTITUINTES:

#### AMILÁCEOS:

**Método 1** (Manual de Técnicas utilizadas no Laboratório de Controle de qualidade. Lucimar Augusta dos Santos Senra. Não publicado. 1979. 94 p. EPAMIG/DTA/ILCT.):

Pipetar para um tubo de ensaio 5 mL de amostra. Ferver em chama de lamparina a álcool e resfriar em água corrente. Juntar 5 gotas de solução iodo-iodetada.

Positivo: Coloração azul.

**Preparo da solução iodo-iodetada:** Pesar 5 g de iodo, mais 10 g de iodeto de potássio R e água destilada q.s. 100 mL.

**Método 2 (Brasil, Ministério da Agricultura – LANARA – Métodos Analíticos Oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – volume II – Métodos Físico e Químicos, Brasília – 1981, D. F. P. irreg.):**

Transferir 10 mL de leite para tubo de ensaio e aquecer até ebulição em banho-maria fervente, mantendo o aquecimento por 5 minutos. Esfriar em água corrente. Adicionar 5 gotas de solução de lugol ou tintura de iodo. Na presença de amido aparecerá coloração azul.

**Método 3 (Pereira, J. F. Análise de alimentos – Processos gerais, mel, leite e derivados. Juiz de Fora, 1980, p. irreg.):**

Pipetar para um tubo de ensaio 5 mL da amostra; ferver em chama de lamparina a álcool, resfriar em água corrente e juntar 5 gotas de solução de lugol. Positivo (presença de amiláceos): coloração azul.

**Método 4 (São Paulo – Instituto Adolfo Lutz – Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – volume I – Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo, 1985, 533p.):**

Medir 10 mL da amostra em uma proveta. Transferir para um tubo de ensaio. Aquecer até a ebulição em bico de Bunsen. Resfriar em água com gelo. Adicionar duas gotas de solução alcoólica de iodo a 1%. Na presença de amido aparecerá uma coloração azul (que desaparecerá por aquecimento).

**Método 5 (Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 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 de 14/12/2006 , Seção 1 , Página 8):**

Transferir 10 mL de leite fluido ou de leite em pó reconstituído para tubo de ensaio, aquecer até ebulição em banho-maria e deixar por 5 minutos. Esfriar em água corrente. Adicionar às amostras preparadas 2 gotas de solução de Lugol e observar a coloração produzida.

Positivo: coloração azul.

**Observação:** O princípio do método é descrito, como “O amido com o iodo forma um composto de adsorção de coloração azul”.

**Método 6 (Pereira, D. B. C. et al. Físico-química do Leite e Derivados – Métodos analíticos. 2 ed. Templo Editora. Juiz de Fora, 2001. 234 p.):**

Pipetar ,para um tubo de ensaio, 5 mL de leite. Ferver em chama de lamparina ou bico de Bunsen, resfriar em água corrente e acrescentar 5 gotas de solução de lugol.

Coloração azul: presença de amiláceos.

**Preparo da solução de Lugol:** Dissolver 100g de iodeto de potássio e 50 g de iodo em 100 mL de água destilada; completar o volume com água destilada para 1 litro de solução.

#### CLORETOES:

**Método 1 (Manual de Técnicas utilizadas no Laboratório de Controle de qualidade. Lucimar Augusta dos Santos Senra. Não publicado. 1979. 94 p. EPAMIG/DTA/ILCT.):**

Misturar, num tubo de ensaio, partes iguais (1 mL) de amostra, nitrato de prata a 10% SR e cromato de potássio 5% SR.

Positivo: Coloração amarela.

**Método 2 (Brasil, Ministério da Agricultura – LANARA – Métodos Analíticos Oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – volume II – Métodos Físico e Químicos, Brasília – 1981, D. F. P. irreg.):**

Em tubo de ensaio, colocar 10 mL de leite. Adicionar 8 a 10 gotas de solução de cromato de potássio a 5 % e agitar. Acrescentar 4,5 mL de nitrato de prata 0,1 mol/L (0,1 N) e agitar. A coloração amarela indica a presença de cloretoes em quantidade superior à faixa normal. Se o leite contém cloretoes dentro da faixa normal, a coloração pode variar de alaranjado escuro ao vermelho tijolo.

**Método 3 (Pereira, J. F. Análise de alimentos – Processos gerais, mel, leite e derivados. Juiz de Fora, 1980, p. irreg.):**

Pipetar para um tubo de ensaio 2 mL da amostra; juntar 2 mL do reagente “A” de M. Miglievich (nota: homogeneíze antes de usar) e

mL do reagente "B" de M. Miglievich. Positivo: cor amarela.

#### Preparo das soluções:

1. Solução A: cromato de potássio a 5% (m/v) acrescido de carbonato de cálcio à saturação.
2. Solução B: nitrato de prata 0,74% (m/v).

**Método 4 (Pereira, J. F. Análise de alimentos – Processos gerais, mel, leite e derivados. Juiz de Fora, 1980, p. irreg.):**

Misturar, num tubo de ensaio, partes iguais (1 mL) da amostra, de nitrato de prata 10% SR e cromato de potássio 5% SR. Positivo: cor amarela.

**Método 5 (Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 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 de 14/12/2006, Seção 1, Página 8):**

Em tubo de ensaio colocar 10 mL de leite, adicionar 0,5 mL de solução de cromato de potássio a 5% e 4,5 mL de solução de nitrato de prata 0,1 mol/L (0,1 N) e agitar. Positivo: coloração amarela.

**Observação:** O princípio do método é descrito, como "Fundamenta-se na reação do nitrato de prata com os cloreto em presença de cromato de potássio como indicador."

O resultado positivo de coloração amarela indica a presença de cloreto em quantidades superiores à faixa normal (0,08 a 0,1%).

**Método 6 (Pereira, D. B. C. et al. Físico-química do Leite e Derivados – Métodos analíticos. 2 ed. Templo Editora. Juiz de Fora, 2001. 234 p.):**

Mistura, em um tubo de ensaio, partes iguais (1 mL) de leite, nitrato de prata 10% (m/v) S.R. e de cromato de potássio 5% (m/v) S.R.; e agitar.

Coloração amarela: presença de cloreto.

#### AÇÚCARES:

**Método 1 (Manual de Técnicas utilizadas no Laboratório de Controle de qualidade. Lucimar Augusta dos Santos Senra. Não publicado. 1979. 94 p. EPAMIG/DTA/ILCT.):**

Colocar num tubo de ensaio partes iguais (2 mL) da amostra e de ácido clorídrico R. Agitar até dissolução e deixar em banho-maria 2 a 3 minutos.

Positivo: coloração amarela.

**Método 2 (Brasil, Ministério da Agricultura – LANARA – Métodos Analíticos Oficiais para o**

controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – volume II – Métodos Físico e Químicos, Brasília – 1981, D. F. P. irreg.):

Transferir para um bêquer de 150 mL, 45 mL de leite. Adicionar 2 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 2 mL de solução de acetato ou sulfato de zinco a 30%. Agitar por 30 segundos e deixar em repouso por 5 minutos. Filtrar. Transferir 1 mL do filtrado para cápsula de porcelana. Adicionar 10 gotas da Solução Reagente. Aquecer em chama baixa, levando a ebulição por um minuto.

Em presença de sacarose, aparecerá coloração azul.

**Preparo da Solução Reagente:** Dissolver 4 g de uréia e 2,2 g de cloreto estanhoso em 10 mL de solução de ácido sulfúrico a 40%, usando aquecimento para auxiliar a dissolução. O reativo deve ser recentemente preparado.

**Método 3 (Brasil, Ministério da Agricultura – LANARA – Métodos Analíticos Oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – volume II – Métodos Físico e Químicos, Brasília – 1981, D. F. P. irreg.):**

Transferir 10 mL de leite para um tubo de ensaio. Adicionar 1 mL de ácido clorídrico concentrado e 0,1 g de resorcina. Agitar e aquecer em banho-maria por 5 minutos. Na presença de sacarose aparecerá uma coloração rosa imediata. O resultado será negativo caso a coloração apareça posteriormente, o que pode ocorrer devido à hidrólise da lactose (açúcar natural do leite).

**Método 4 (Pereira, J. F. Análise de alimentos – Processos gerais, mel, leite e derivados. Juiz de Fora, 1980, p. irreg.):**

Colocar, num tubo de ensaio, parte iguais (1 mL) da amostra e ácido clorídrico R; agitar até dissolução e deixar em banho-maria por 2 – 3 minutos.

Positivo: coloração escura, tendendo a preta.

**Método 5 (São Paulo – Instituto Adolfo Lutz – Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – volume I – Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985, 533p.):**

Medir 45 mL de amostra em um proveta. Transferir para um bêquer de 100 mL. Aquecer em banho de água a 90 °C. Adicionar 45 mL de solução amoniaca de acetato de chumbo, preparada no momento do uso. Agitar durante 30 segundos. Deixar em repouso por 4 minutos. Filtrar. Transferir 3 mL do filtrado para um tubo de ensaio. Adicionar 3 mL de solução de difenilamina. Aquecer em banho-maria por 10 minutos. Em presença de sacarose, aparecerá coloração azul.

#### Preparo das soluções:

1. Solução amoniaca de acetato de chumbo: Acrescer, a 50 g de acetato de chumbo, 120 mL de água destilada. Misturar 50 mL desta solução a 50 mL de hidróxido de amônio a 15%. Preparar no momento do uso.
2. Solução de difenilamina: 1 g de difenilamina, 10 mL de álcool etílico, 25 mL de ácido acético glacial, 65 mL de ácido clorídrico.

**Método 6 (São Paulo – Instituto Adolfo Lutz – Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – volume I – Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985, 533p.):**

Medir 15 mL da amostra em uma proveta. Transferir para um tubo de ensaio de 50 mL. Adicionar 1 mL de ácido clorídrico e 0,1 g de resorcina. Agitar. Aquecer em banho-maria por 5 minutos.

Em presença de sacarose, aparecerá coloração vermelha.

**Método 7 (Pereira, D. B. C. et al. Físico-química do Leite e Derivados – Métodos analíticos. 2 ed. Templo Editora. Juiz de Fora, 2001. 234 p.):**

Misturar, em um tubo de ensaio, partes iguais (1 mL) de leite e de ácido clorídrico p.a.; agitar até dissolução e deixar em banho-maria por 2 – 3 minutos.

Coloração escura: presença de açúcares.

#### OUTROS RECONSTITUINTES:

**URINA (Manual de Técnicas utilizadas no Laboratório de Controle de qualidade. Lucimar Augusta dos Santos Senra. Não publicado. 1979. 94 p. EPAMIG/DTA/ILCT.):**

Misturar, num tubo de ensaio, partes iguais (2 mL) da amostra e do reativo "U" (preparado no momento do uso). Aquecer em chama de lamparina 2 a 3 minutos.

Positivo: coloração rosa.

**Preparo do reativo "U":** Misturar 2 mL de ácido sulfúrico 50% SR com 1 mL de ácido clorídrico R e 3 mL de álcool absoluto R. Este reativo deve ser preparado no momento do uso.

**ÁLCOOL ETÍLICO (Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 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 de 14/12/2006, Seção 1, Página 8):**

Lácteos. Diário Oficial da União de 14/12/2006, Seção 1, Página 8):

Medir 100 mL da amostra e transferir para kitazato (500 mL). Adicionar 10 mL de antiespumante (solução a 3%) e misturar bem. Transferir para um tubo de ensaio 2 mL da solução sulfocrômica e mergulhar nessa solução a extremidade da pipeta de Pasteur acoplada ao kitazato por um tubo de silicone ou látex, de modo a formar um sistema fechado. Aquecer a amostra contida no kitazato mantendo em fervura por 5 minutos.

Negativo: coloração da solução sulfocrômica inalterada ou levemente amarelo-acinzentada.

Positivo: coloração da solução sulfocrômica verde.

Interferente: formaldeído.

**Preparo da solução sulfocrômica:** Dissolver 1,15 g de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) p.a. em 10 mL de água, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) p.a.

**Observação:** O princípio do método é descrito: Na presença de álcool etílico em meio ácido ocorre a redução do cromo+6 a cromo+3, modificando a coloração da solução sulfocrômica.

**GELATINA (Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 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 de 14/12/2006, Seção 1, Página 8):**

Transferir 10 mL ou 10 g de amostra (leite fluido e leite fermentado) para um bêquer de 100 mL. Adicionar 10 mL de solução de nitrato de mercúrio e misturar. Adicionar 20 mL de água e misturar novamente. Deixar em repouso por 5 minutos e filtrar para bêquer de 50 mL. Transferir 5 mL do filtrado obtido para tubo de ensaio e adicionar igual volume de solução saturada de ácido pícrico. Fazer em paralelo uma prova em branco para comparação final. Observar os tubos no momento e tornar a observá-los no dia seguinte. Opcionalmente, a solução ácida de nitrato de mercúrio 0,265 N poderá ser substituída por uma solução de nitrato de mercúrio II 0,1 N. Neste caso, aos 10 mL ou 10 g da amostra adicionar 25 mL da solução de nitrato de mercúrio II 0,1 N e misturar. Adicionar 5 mL de água e misturar novamente. Deixar em repouso por 5 minutos e filtrar para bêquer de 50 mL. A partir deste ponto,

seguir o procedimento já descrito.

Positivo: formação de um precipitado

amarelo, de partículas finamente divididas que sedimentam lentamente. Após uma noite em repouso o depósito viscoso estará aderido no fundo e nas paredes laterais do tubo, de tal forma que, agitando e vertendo o tubo com enxague simples não se desprenderá.

Negativo: formação de um precipitado amarelo floculento, com produção de um soro praticamente límpido. Esse precipitado não adere às paredes do tubo e é facilmente removível com água, mesmo após uma noite de repouso.

Prova em branco: filtrado levemente turvo. Após repouso, o depósito se desprenderá facilmente do fundo do tubo por simples agitação.

**Preparo da Solução ácida de nitrato de mercúrio** (Hg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 0,265 N: mercúrio (Hg) dissolvido em duas vezes o seu peso em ácido nítrico, e essa solução diluída 25 vezes o seu volume com água, ou solução de nitrato de mercúrio II monohidratado Hg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 0,1 N;

**Observação:** O princípio do método é descrito: "Baseia-se nas características da formação de um precipitado da gelatina com ácido pírico."

#### SORO DE QUEIJO

**Método 1 (Brasil,** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 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 de 14/12/2006, Seção 1, Página 8):

Para leite fluido, a amostra é preparada medindo 10 mL de leite fluido para um bêquer de 50 mL Para leite desidratado, pesar 10 g de leite em pó desnatado ou 13 g de leite em pó integral, dissolver em 100 mL de água morna, sob agitação, para homogeneizar. Pipetar 10 mL da reconstituição para bêquer de 50 mL.

Adicionar à amostra preparada, com auxílio de bureta, 5 mL de solução de ácido tricloroacético a 24 % ,sob agitação constante, num intervalo de 2 minutos. Deixar em repouso por 60 minutos a 25°C e filtrar descartando as primeiras gotas do filtrado. Injetar 20 ou 30 iL de cada filtrado no cromatógrafo com fluxo da fase móvel de 1,5 ou 1 mL por minuto respectivamente.

Comparar o cromatograma da amostra com o de leite adicionado de soro. Identificar o pico com mesmo tempo de retenção do soro. Calcular a porcentagem de soro na amostra por interpolação da leitura do sinal, na reta de regressão do leite adicionado de soro.

**Curvas de calibração:** Soro, de queijo, em pó: determinar a umidade do soro em pó para correção da massa utilizada;

Soro de queijo, líquido: pesar 1,25 g de coalho em pó (1:30.000), adicionar 0,85 g de cloreto de sódio (NaCl) p.a., transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água destilada deionizada. Adicionar 4 mL desta solução a um bêquer contendo 500 mL de leite cru a 32°C. Aguardar 30 minutos, cortar, agitar e dessorar a massa coagulada para separar o soro obtido. Coletar o soro em erlenmeyer de 500 mL e aquecer até princípio de fervura para inativar a enzima do coalho.

Preparo da curva de leite fluido adicionado de soro de queijo, líquido: pesar alíquotas de 9,5; 9,0; 8,5 e 8,0 g, de leite isento de soro (amostra branca), em bêquer de 50 mL. Acrescentar alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g de soro, de queijo, líquido a cada um deles respectivamente. Preparar um branco, pesando 10 g de leite isento de soro, em bêquer de 50 mL . Adicionar a cada bêquer, 5 mL de solução de ácido tricloroacético a 24 % , sob agitação constante, num intervalo de 2 minutos. Deixar em repouso por 60 minutos a 25°C e filtrar descartando as primeiras gotas do filtrado. Injetar 20 ou 30 iL de cada filtrado no cromatógrafo com fluxo da fase móvel de 1,5 ou 1 mL por minuto respectivamente. Construir o gráfico de % de soro versus a intensidade do sinal do detector e calcular a reta de regressão aceitando valores de R > 0,95.

Preparo da curva de leite em pó adicionado de soro, de queijo, em pó: construir uma curva com concentrações de soro de queijo conhecidas, como por exemplo: 5, 10 e 15 % (m/m). Pesar alíquotas variadas de soro, de queijo, em pó representando 5, 10 e 15%, adicionar, a cada uma, quantidades suficientes de leite em pó (amostra branca) para totalizar 13 g (para leite em pó integral) ou 10 g (para leite em pó desnatado). Reconstituir adicionando 100 mL de água morna e agitar para homogeneizar. Pipetar 10 mL de cada reconstituição para bêquer de 50 mL. Adicionar, a cada um, 5 mL de solução de ácido tricloroacético a 24 % ,sob agitação constante, num intervalo de 2 minutos. Deixar em repouso por 60 minutos a 25°C e filtrar descartando as primeiras gotas do filtrado. Injetar 20 ou 30 iL de cada filtrado no cromatógrafo com fluxo da fase móvel de 1,5 ou 1 mL por minuto respectivamente. Construir o gráfico de % de soro versus a intensidade do sinal do detector e calcular a reta de regressão aceitando valores de R > 0,95.

#### Preparo das soluções:

1. Fase móvel tampão pH 6,0: dissolver 1,74 g de hidrogenofosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

p.a.; 12,37 g de dihidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) p.a. e 21,41 g de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) p.a. em, aproximadamente, 700 mL de água destilada deionizada. Ajustar o pH da solução para 6,0 usando solução de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 1 N ou solução de hidróxido de potássio (KOH) a 50%. Completar o volume para 1000 mL com água destilada deionizada e filtrar a solução, antes do uso, em membrana filtrante de 0,45 mm. Desgaseificar antes do uso.

**Observação:** O princípio é descrito: "Baseia-se na detecção de caseínomacopeptídeo (CMP) por cromatografia líquida de alto desempenho,método da filtração em gel.

O Cromatógrafo líquido utilizado deve ser equipado com detector UV a 205 nm e coluna Zorbax GF 250 Bioséries da Agilent de 9 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento, ou equivalente.

**Método 2** (Pereira, D. B. C. et al. Físico-química do Leite e Derivados – Métodos analíticos. 2 ed. Templo Editora. Juiz de Fora, 2001. 234 p.):

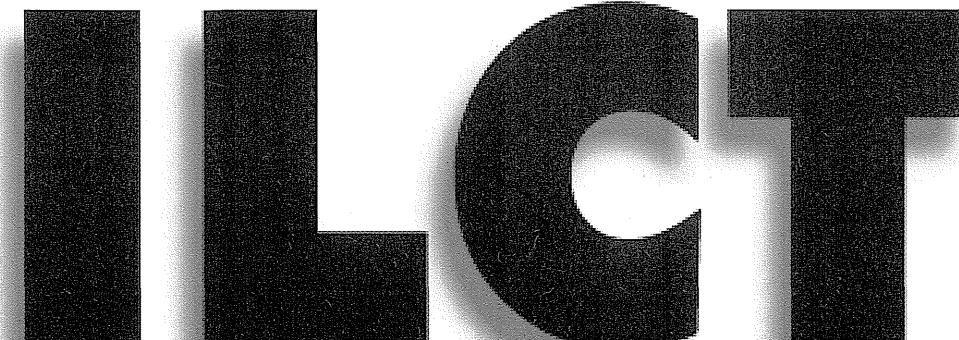
Transferir, para um bêquer de 250 mL, 25 mL da amostra de leite e adicionar, sob cuidadosa agitação, 25 mL de ácido tricloroacético 24% (m/v). Deixar em repouso por 30 minutos e filtrar através de papel-filtro quantitativo para erlenmeyer de 125 mL. Transferir 25 mL do

filtrado pra um tubo de centrifuga, com capacidade aproximada de 35 mL. Adicionar 1 mL de ácido fosfotungstico 20% (m/v), deixar em repouso por 10 minutos e centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e dispersar o sedimento com auxílio de um bastão de vidro e de 3 mL de etanol 95% (v/v). Rinsar o bastão de vidro com mais 1 mL de etanol e centrifugar por 10 minutos. Descartar o etanol e secar o sedimento a 35-40 °C por 30 minutos. Adicionar 3 ml de ácido sulfúrico 0,05 mol/L e manter o tubo tampado em banho-maria a 80°C por, rigorosamente, 40 minutos. Esfriar à temperatura ambiente. Pipetar 2 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio com tampa de rosca e capacidade 10 mL. Adicionar 0,5 mL do reativo de Erlich. Manter o tubo tampado em banho-maria fervente por 30 minutos e esfriar em banho de gelo até temperatura ambiente.

O desenvolvimento de coloração violácea indica a presença de soro proveniente de coagulação enzimática. Leite genuíno apresenta coloração amarelada ou ligeiramente rosea.

**Preparo do reativo de Erlich:** Pesar 5 g de p-dimetilaminobenzaldeído e transferir para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 20-25 mL de água destilada. Manter a mistura insolúvel na geladeira (4 °C) por até 48 horas. No momento do uso, adicionar ácido clorídrico 37% (m/v) até a marca de referência do balão volumétrico.

## ASSINE A REVISTA DO



**CURSOS NA ÁREA DE LEITE E DERIVADOS**

Instituto de Laticínios Cândido Tostes - Maio a Junho de 2007

Responsáveis: Luiza Carvalhaes de Albuquerque

Coordenadora de Transferência e Difusão de Tecnologia

Danielle Braga Chelini Pereira - Coordenadora de Ensino

CT/ILCT/EPAMIG - Juiz de Fora - MG

**12 a 14.04 - Requeijão e Especialidades Lácteas**

Teor: Requeijão Cremoso, Culinário, Cremoso Light, Especialidade Láctea a base de requeijão e para uso culinário e Idéias para novos produtos correlatos. Valor: R\$300,00

**21.05 a 02.06 - Reciclagem Global em Laticínios**

Teor: Introdução e Instrumentação, Microbiologia e Físico-Química do Leite e Derivados, Culturas Lácticas, Tecnologia de Fabricação de Manteiga, Tecnologia de Fabricação de Doce de Leite, Iogurte, Bebidas Lácteas e Queijos: Frescal, Parmesão, Prato, Requeijão, Mussarela, Ricota e Reino.

Valor: R\$600,00

**14 a 16.06 - Curso de Queijos Convencionais I**

Teor: Fabricação de Queijo Minas Padrão, Frescal, Ricota, Mussarela, Manteiga e Requeijão (Culinário, Barra e Cremoso). Valor: R\$300,00

**23 a 25.08 - Curso de Queijos Convencionais I**

Teor: Fabricação de Queijo Minas Padrão, Frescal, Ricota, Mussarela, Manteiga e Requeijão (Culinário, Barra e Cremoso). Valor: R\$300,00

**30.08 a 01.09 - Curso de Iogurte e Bebidas Lácteas**

Teor: Aspectos da Matéria Prima, Tratamento Térmico, Culturas Lácteas, Leites Fermentados, Incubação, Quebra e Resfriamento da Coalhada, Aditivos e Tecnologias de Fabricação. Valor: R\$300,00

**Total de vagas:** Mínimo: 15 alunos. Máximo: 20 alunos. Os cursos iniciam-se às 08:00 e terminam por volta das 17:30 horas com intervalo de 1 (uma) hora para almoço. Aos sábados, os cursos iniciam-se às 08:00 e terminam às 12:00 horas. Os cursos estão sujeitos a cancelamento caso não se alcance o número mínimo de inscritos. Neste caso, os participantes que confirmaram inscrição serão avisados com pelo menos 5 (cinco) dias de antecedência (considerada a data do início do curso) e os valores pagos ao CT/ILCT serão reembolsados. Outros cursos poderão ser agendados para datas fora do calendário pré-determinado. Na certeza da realização dos mesmos e o seu teor entraremos em contato. A programação completa de todos os cursos poderá ser vista no Site: [www.candidotostes.com.br](http://www.candidotostes.com.br)

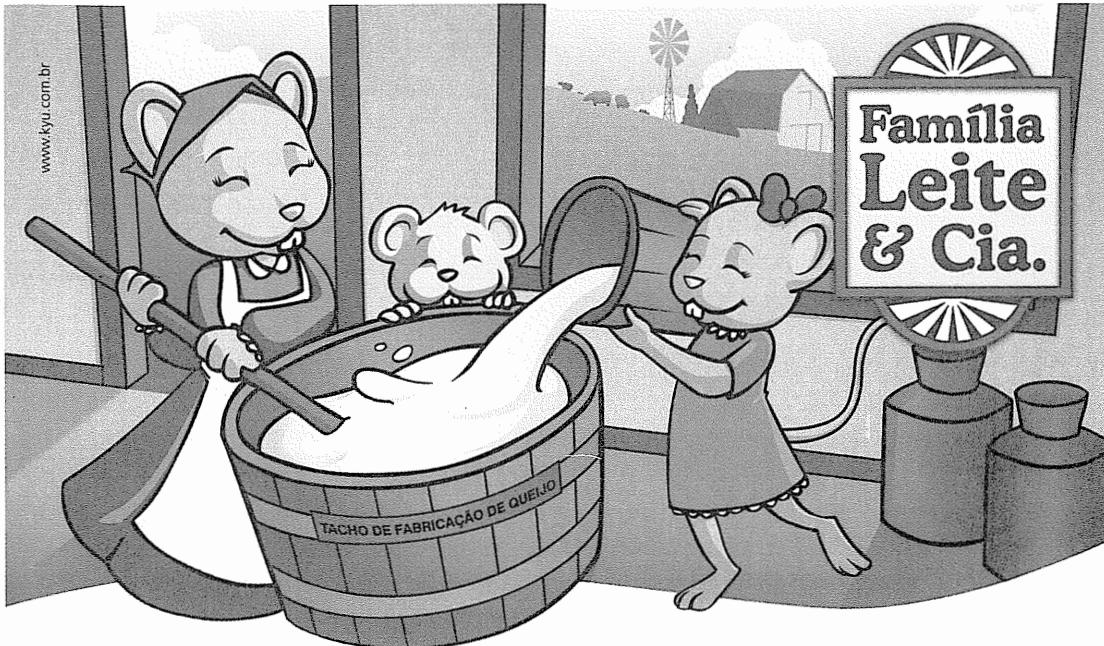
**Instruções para Inscrição nos Cursos:** Para participar dos cursos de pequena duração do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, favor proceder da maneira indicada abaixo:

1. Entrar em contato pelo telefone (32)3224-3116, antes da data de início do curso, para confirmar a realização do mesmo e falar com Luiza Albuquerque ou Marcelle Pompemayer.
2. Após confirmação, efetuar o depósito bancário referente ao valor do curso no Banco do Brasil, Agência 024-8, Conta Corrente nº 3209-3 e Nome do Favorecido: CAIXA ESCOLAR DO ILCT.
3. Enviar comprovante de depósito com o Nome do Cursista e Curso pretendido para o fax (32)3224-5450 ou telefonar para confirmar o depósito e apresentar o comprovante à Secretaria do ILCT antes do início do curso. Importante: Confirme sua inscrição por mail ou telefone.
4. Comparecer à Secretaria do ILCT/EPAMIG com no mínimo 15 minutos de antecedência, munido de documentos e uniforme completo.
5. O cursos iniciam-se às 08:00 e terminam por volta das 17:30 horas com intervalo de 1 (uma) hora para almoço. Aos sábados, os cursos iniciam-se às 08:00 e terminam às 12:00 horas.

**Uniforme Obrigatório:** Devido às rigorosas regras de higiene que são impostas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), fica determinada a obrigatoriedade do uso de uniforme completo por parte dos alunos dos Cursos de Aperfeiçoamento e qualquer outra pessoa que queira entrar no Setor Industrial do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Os alunos que não portarem o uniforme serão impedidos de frequentar aulas práticas. Uniforme exigido: Boné Branco, Camisa, Calça e Jaleco Branco, Bota de Borracha Branca.

Contatos: Luiza Carvalhaes Albuquerque e Marcelle Pompemayer

Fone: (32) 3224 - 3116 - ramal 306 ou 204 ou 32 9979 5602

e-mail: [luiza@acessa.com](mailto:luiza@acessa.com), [ilct@acessa.com](mailto:ilct@acessa.com) e/ou [luiza.albuquerque@epamig.br](mailto:luiza.albuquerque@epamig.br)

DISTRIBUIDOR DE PRODUTOS

**DANISCO**

First you add knowledge...

  
**fermentech**

Central de Atendimento

11 6193 4900 | [www.fermentech.com.br](http://www.fermentech.com.br)