

## Artigo nº 4

### LÁCTEOS SEGUROS

#### ANÁLISES DE ROTINA DO LEITE NA INDÚSTRIA

Na recepção, o leite deve ser analisado, classificado e imediatamente resfriado (SE FOR estocado por algum tempo) ou processado.

Utiliza-se uma série de análises que, **em conjunto**, definem os atributos de qualidade da matéria-prima.

#### **LEGISLAÇÃO BÁSICA SOBRE O ASSUNTO**

- **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, artigo 476;**
- **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leite Cru Refrigerado (ANEXO DA Instrução Normativa nº 51/2002);**
- **Instrução Normativa nº 68/2006 (Métodos Analíticos Físico-Químicos Oficiais para Leite e Produtos Lácteos).**

#### **O QUE DIZ ESSA LEGISLAÇÃO?**

##### 1. Características Sensoriais DO LEITE:

- **Aspecto e Cor:** líquido branco, ou ligeiramente amarelado, homogêneo e sem partículas/substâncias estranhas.
- **Sabor e Odor:** ausência de sabores/odores estranhos.

##### 2. Requisitos gerais:

Ausência de neutralizantes da acidez e reconstituintes de densidade;

Ausência de resíduos de antibióticos ou de outros medicamentos/produtos de uso veterinário;

##### 3. Requisitos Específicos:

###### • Requisitos Físicos e Químicos:

- Matéria Gorda: teor original, com o mínimo de 3,0 g/100 g;
- Densidade: 1,028 a 1,034;
- Acidez titulável: 0,14% a 0,18% em ácido láctico;
- Extrato seco desengordurado: mínimo de 8,4 g/100g;
- Crioscopia: máximo - 0,530°H (equivalente a -0,512°C);
- Proteínas: mínimo 2,90 g/100g.

##### 4. Análises feitas pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL):

- Contagem total de Bactérias (CTB);
- Contagem de Células Somáticas (CCS);
- Teor de componentes do leite.

#### **ANÁLISES QUE A INDÚSTRIA PRECISA FAZER DIARIAMENTE, PARA RECEBER O LEITE:**

1. Temperatura;
2. Teste do Alizarol (no mínimo 0,2% de alizarina em álcool etílico de concentração mínima de 72° GL);
3. Acidez Titulável <sup>(1)</sup>
4. Densidade <sup>(2)</sup>
5. Crioscopia <sup>(3)</sup>
6. Pesquisa de Fosfatase Alcalina <sup>(4)</sup> e de Peroxidase <sup>(5)</sup> (quando se receber leite refrigerado proveniente de outras indústrias);
7. Pesquisa Conservantes <sup>(6.a)</sup> de neutralizantes da acidez <sup>(6.b)</sup> (principais: carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio);
8. Pesquisa de resíduos de detergentes e sanitizantes <sup>(6.c)</sup>;
9. Pesquisa de reconstituintes da densidade <sup>(6.d)</sup> (açúcar, sal de cozinha, amido, dextrinas);
10. Glicídios Redutores em Lactose <sup>(7)</sup>;
11. Teor de Sólidos totais do Leite <sup>(8)</sup>;
12. Teor de Gordura; <sup>(9)</sup>
13. Outras pesquisas, de aplicação periódica (pesquisa de antibióticos, etc) ou de acordo com suspeitas.

### **DETALHES TÉCNICOS DAS ANÁLISES DE ROTINA:**

#### **(1) Determinação da Acidez Titulável do Leite Fluído**

- A **acidez aparente** do leite é aquela que ele apresenta quando ainda não houve desenvolvimento da verdadeira acidez, fruto da fermentação da lactose e formação de ácido láctico por microorganismos. A acidez é devida à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos, podendo variar de 13 a 17°D. Eventualmente essa faixa pode ser mais ampla, dependendo da individualidade e da raça da vaca.
- Em geral, as raças que apresentam elevado teor de gordura no leite mostram também uma acidez aparente mais alta, devido ao aumento percentual de caseína e fosfato. Tal leite é idêntico em qualidade àquele que mostra menor acidez aparente. Daí a necessidade de bastante critério no julgamento da qualidade de um leite, simplesmente através da prova de acidez titulável.
- O leite fresco logo após a ordenha, não contém mais do que 0,002% de ácido láctico (o que, expresso em °D, daria 0,2°D). O aumento na acidez acima da aparente deve-se normalmente à produção de ácido láctico a partir de lactose por microrganismos.
- A acidez do leite, determinada por titulação, é afetada por condições que provoquem alterações no fosfato de cálcio da amostra. Esse composto está presente como fosfato dicálcico e, mediante a adição de NaOH, parte dele converte-se imediatamente em fosfato tricálcico e, finalmente, em ácido fosfórico. Isso, naturalmente, aumentará a acidez da amostra. Alguns dos fatores que afetam essa reação são: velocidade de titulação, diluição da amostra, quantidade de indicador e temperatura do leite.
- Um analista que titule rapidamente obtém teor de acidez mais baixo do que o operador que trabalha lentamente, já que qualquer demora acarreta maior precipitação de fosfato tricálcico e conseqüente formação de ácido fosfórico. Recomenda-se um tempo de titulação entre 20 e 30 segundos.
- **A diluição da amostra com água, antes da titulação, provoca leitura abaixo do esperado, posto que a adição de água interrompe a taxa de precipitação de fosfato tricálcico. Quantidades iguais de água e leite acarretam leitura inferior em 2°D à leitura real da acidez.**
- Quanto maior a quantidade de indicador usada, mais rapidamente aparece coloração rósea na titulação e, conseqüentemente, obtém-se leitura mais baixa. Se a fenolftaleína for a 2%, usar 2 – 3 gotas. Se for a 1%, adicionar 4 – 5 gotas.
- A temperatura das amostras afeta os resultados das titulações; quanto maiores as temperaturas, mais elevados os resultados. Daí ser conveniente titular o leite sob baixas temperaturas.
- O colostro apresenta acidez titulável elevada devido ao elevado teor protéico e mineral.
- O leite de animais com mastite aguda pode apresentar uma acidez titulável de 10°D – 12°D ou ainda menor.
- A hidrólise da gordura aumenta a acidez titulável por liberação de ácidos graxos. Tal hidrólise pode ser causada por enzimas, pela homogeneização do leite cru, pela sua agitação vigorosa ou pelo resfriamento ou aquecimento do leite a certas temperaturas: o resfriamento a 4°C, seguido de aquecimento a 30°C e posterior resfriamento a 4°C constituem operações capazes de ativar enzimas que provocarão hidrólises da gordura do leite.
- **Observação:** A acidez titulável é geralmente apresentada como se a acidez acusada pela titulação com NaOH 0,1N ou NaOH N / 9 se devesse somente ao ácido láctico. Na realidade, mede-se, dessa maneira, apenas a quantidade de soda necessária para levar o pH do leite a aproximadamente 8,3, que é o ponto onde a fenolftaleína exhibe sua coloração rósea característica. Esta é uma medida da capacidade tamponante do leite. O leite recém-ordenhado contém muito pouco ou quase nenhum ácido láctico. O crescimento bacteriano pode resultar, usualmente, mas nem sempre, em alteração do valor da titulação, a qual pode ser parcialmente devida ao ácido do láctico. Por essa razão, o teste de acidez, como é comumente usado, é de valor apenas quando empregado com uma apreciação global do seu significado.

**(2) Determinação da Densidade do Leite Fluido**

- Essa análise é feita usualmente com o propósito de calcular o teor de sólidos do leite pelo disco de ACKERMANN, assim como para verificação de sua conformidade frente à legislação sanitária.
- A densidade de uma substância é a relação entre o seu peso e igual volume de outra substância tomada com referência. A densidade média do leite integral normal é 1,0320 a 16°C. Inúmeros pesquisadores observam que a temperatura de 16°C é a mais **inadequada** que poderia ser escolhida para determinação da densidade, de vez que a gordura não se encontra em seu estado físico próprio (líquido) nessa temperatura. A gordura sólida tem densidade maior que a gordura líquida na mesma temperatura; desse modo, se o leite for mantido por algum tempo sob baixa temperatura e, em seguida, sofrer aquecimento a 16°C, apresentará densidade maior que se estiver aquecido e sofrer resfriamento a 16°C imediatamente antes da determinação da densidade. No primeiro caso, a gordura estará mais ou menos sólida e, no segundo, mais ou menos líquida.
- O procedimento mais adequado, conforme preconiza a FIL/IDF, consiste no aquecimento e manutenção do leite a 40 – 45°C por 5 minutos, com cuidadosa, mas completa agitação do leite, evitando incorporação de ar à amostra, seguindo-se resfriamento a 20°C ± 2°C e imediata determinação da densidade. A leitura deve ser feita no máximo em 30 segundos.
- O leite normal pode ter sua densidade variando entre 1,029 e 1,035, com a maioria das amostras situando-se entre 1,030 e 1,033. Um leite com baixo teor em gordura apresentará menor densidade enquanto que uma amostra com alto teor de gordura mostrará alta densidade. À primeira vista, poderá parecer que o inverso é o verdadeiro, devido à baixa densidade da gordura; entretanto no leite normal o teor de Sólidos Não Gordurosos aumenta na medida em que aumenta o teor de gordura. O efeito combinado das densidades dos primeiros anula o efeito do maior teor de gordura, que como se sabe, tem densidade bem inferior à dos demais sólidos lácteos.
- Diversos pesquisadores observam que, quando o leite permanece em repouso por algumas horas após a ordenha, a densidade tende a aumentar rapidamente por um curto espaço de tempo até tornar-se estabilizada. Esse aumento da densidade é atribuído ao escapamento de gases incorporados ao leite. Daí a importância de se determinar a densidade após 4 – 5 horas de ordenha e de se evitar qualquer tipo de incorporação de ar ao produto.

**(3) Determinação do Índice Crioscópico (FIL/IDF, Doc. 154/1983):**

O ponto de congelamento do leite depende principalmente da lactose e sais, havendo, nestes últimos, preponderância de cloretos. A concentração molar desses componentes em leite com 12,5% de sólidos, 4,75% de lactose e 0,1% de cloretos é de 0,296 e de 0,119, respectivamente, respondendo os mesmos por aproximadamente 55% e 25% da depressão do ponto crioscópico (DPC). Os demais 20% são devido a outros constituintes solúveis (cálcio, potássio, magnésio, lactatos, fosfatos, citratos, etc).

*Certas expressões devem ser esclarecidas, para evitar confusões bastante comuns:*

- *Quanto maior o ponto de congelamento (isto é, mais próximo de zero grau) maior a probabilidade de que o leite contenha água estranha. Com o mesmo objetivo usa-se outra nomenclatura, a Depressão do Ponto Crioscópico (ou de Congelamento), DPC: quanto menor a DPC (isto é, mais próxima de zero grau), maior a possibilidade de a amostra ter sido fraudada com água.*
- *O ponto de congelamento do leite é praticamente constante, embora a concentração dos constituintes solúveis possa variar substancialmente. Acredita-se que essa estabilidade seja devido ao fato de que o leite encontra-se em equilíbrio osmótico com o sangue do animal que o produz.*
- *O ponto de congelamento do leite de vacas depende da raça, do estágio de lactação, da estação do ano, da alimentação, do acesso à água, do clima, da 1ª ou 2ª ordenha, entre os outros fatores.*
- *O tratamento térmico do leite não altera significativamente o ponto de congelamento do leite, a não ser que seja realizado concomitantemente com tratamento a vácuo, o qual pode provocar aumento de ponto de congelamento de 0,005°C, equivalente a ± 1% de adição de água. Isso se deve ao fato de que o vácuo retira parcial ou totalmente os gases dissolvidos no leite.*

- Devido às possibilidades de variação do ponto de congelamento do leite, conforme visto anteriormente, não há um valor que possa ser empregado como padrão no caso de comparação com o resultado de um teste feito com uma amostra simples. É muito comum a utilização de um valor tal como  $-0,550^{\circ}$ , ou  $0,540^{\circ}$ , como padrão, sem que tenha sido adotado o procedimento adequado para sua escolha. É até possível que possa ocorrer uma coincidência com esses valores, mas a metodologia analítica carecerá de sustentação científica. É necessário, pois, tomar **amostra autêntica** do leite produzido em cada região, ou quando isso for dificultado por razões materiais, do leite que é fornecido a cada indústria.
- Amostra autêntica é aquela proveniente de ordenha completa do rebanho, supervisionada por um técnico; a ordenha pode ser realizada tanto pela manhã quanto à tarde de um dia, desde que o intervalo de tempo entre esta ordenha e a última a que foi submetido o rebanho não seja inferior a 11 horas nem superior a 13 horas. A amostra será colhida de um tanque onde seja possível misturar todo o leite do rebanho. No caso da ordenha mecânica, proceder à colheita da amostra antes da lavagem de tanques e tubulações ou após passagem de uma determinada quantidade de leite pelos mesmos, para assegurar a remoção de resíduos de água e de outras substâncias. Para estabelecer o ponto de congelamento do leite fornecido a uma indústria, determinar o ponto de congelamento de cada rebanho (“amostras autênticas”), calcular a média e comparar com o valor obtido nas verificações do “leite de conjunto”. Será conveniente calcular essa média das amostras autênticas em diferentes estações do ano.

Considerar, ainda, no processo de colheita de amostras autênticas, a necessidade de abranger diversas outras variáveis, como alimentação do rebanho, a raça, o tamanho do rebanho, as diferenças geográficas dentro da mesma região, etc.

Todas as substâncias empregadas na calibração de um crioscópio devem estar na mesma temperatura, entre  $+7^{\circ}\text{C}$  e  $+10^{\circ}\text{C}$ ; isso é válido também para o leite, quando for determinado seu ponto de congelamento. Entretanto, deve ser evitado o congelamento da amostra ou, até mesmo, sua refrigeração entre  $0^{\circ}$  e  $5^{\circ}\text{C}$ , o que pode afetar a DPC por alteração da solubilidade de sais.

- Além da água, devem ser utilizadas soluções que tenham ponto de congelamento conhecido. As mais usadas são as de sacarose pura a 7% e 10% e as de Cloreto de Sódio. Hortvet, em seu trabalho original sobre a crioscopia do leite, publicado em 1921, atribuiu às soluções de sacarose a 7% e 10% os pontos de congelamento de  $-0,422^{\circ}\text{C}$  e  $-0,621^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Ocorre que esses valores não correspondem ao verdadeiro ponto de congelamento de tais soluções. Na verdade, técnicas analíticas modernas estipularam os valores reais de  $-0,408^{\circ}\text{C}$  para a solução a 7% e  $-0,600^{\circ}\text{C}$  para a de 10% de sacarose. Isso também tem ocasionado muita confusão até hoje. Convencionou-se, então, expressar os resultados do teste em graus Hortvet ( $^{\circ}\text{H}$ ) quando se trabalha com valores de  $-0,422^{\circ}$  e  $-0,621^{\circ}$  e em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) quando são utilizados os valores de  $-0,408^{\circ}$  e  $-0,600^{\circ}$  para as soluções de sacarose 7% e 10%, respectivamente; a tendência internacional é expressar os resultados em  $^{\circ}\text{C}$ .

Como as soluções de sacarose perdem-se com facilidade, tem-se recomendado o emprego de soluções de Cloreto de Sódio, mais estáveis; entretanto, certos autores opinam que, sendo ionizável, o NaCl pode alterar o valor das medições. A FIL/IDF recomenda o emprego de soluções de NaCl (Doc. 154/1983).

Para o preparo de soluções, usar:

6,859g. NaCl/1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $-0,408^{\circ}\text{C}$  ou  $-0,422^{\circ}\text{H}$ );

10,155g. NaCl/1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $-0,600^{\circ}\text{C}$  ou  $0,621^{\circ}\text{H}$ );

ou

7g. de sacarose pura/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $-0,408^{\circ}\text{C}$  ou  $-0,422^{\circ}\text{H}$ );

10g. de sacarose pura/100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^{\circ}\text{C}$  ( $-0,600^{\circ}\text{C}$  ou  $-0,621^{\circ}\text{H}$ ).

Se for conveniente, transformar  $^{\circ}\text{H}$  em  $^{\circ}\text{C}$  pela fórmula:

$$^{\circ}\text{C} = 0,96418 \times ^{\circ}\text{H} + 0,00085$$

Trabalhando apenas com  $^{\circ}\text{C}$  e querendo transformar o resultado em  $^{\circ}\text{H}$ , usar a fórmula:

$$^{\circ}\text{H} = 1,03711 \times ^{\circ}\text{C} - 0,00085$$

**Observação:** fórmulas extraídas do “Provisional Internacional IDF Standard 108: 1982”.

Para estimar a porcentagem de água adicionada ao leite, aplicar a fórmula (Documento 154, da FIL/IDF, 1983):

$$\% \text{ água} = \frac{A - B}{A} \times (100 - \text{ST})$$

A

A = Ponto crioscópico de amostra autêntica ou outro valor assumido oficialmente como referência;

B = Ponto crioscópico do leite sob análise;

ST = Porcentagem massa/massa dos sólidos totais da amostra.

- *Por esta fórmula, torna-se patente a necessidade de determinar-se o ponto de congelamento padrão de cada região, sob pena de se cometerem injustiças na interpretação dos resultados da análise. Aumentos ou reduções no teor de sólidos totais implicarão maiores ou menores depressões do ponto de congelamento das amostras, em função das variações na sua concentração molar.*
- *Comparando-se os resultados das análises de amostra autêntica e de amostra sob suspeita, caso a diferença situe-se no intervalo igual ou inferior a  $0.010^{\circ}H$  pode-se afirmar que esta última está livre de água adicionada, desconsiderando-se, obviamente, a possibilidade de dupla fraude por adição de água e de reconstituintes.*

#### (4) Pesquisa de Fosfatase Alcalina

A enzima fosfatase alcalina ou fosfomonoesterase alcalina, que está sempre presente no leite cru, catalisa a hidrólise de fosfatos orgânicos (ésteres), liberando ácido fosfórico e fenol. Essa fosfatase é inativada pela exposição às temperaturas de pasteurização de  $61.7^{\circ}C/30$  minutos e  $71,1^{\circ}C/15$  segundos.

Se o tratamento térmico situar-se abaixo dessas especificações, alguma fosfatase residual permanecerá ativa e, sob condições de laboratório cuidadosamente controladas, libera fenol a partir de uma solução tamponada de fenilfosfato dissódico, em pH aproximadamente 9,6, que é o ótimo para a atividade de enzima.

**A presença de fenol livre** é determinada por um teste colorimétrico. O leite corretamente pasteurizado produzirá uma solução levemente cinza ou relativamente desprovida de coloração, enquanto que o leite cru e o leite insuficientemente pasteurizado produzirão soluções de cor azul (mais e menos intensa, respectivamente).

O analista deverá ter cuidado com a vidraria, rolhas de borracha e outros materiais com os quais as amostras e reagentes podem entrar em contato durante o teste, visando eliminar qualquer traço de fosfatase, fenol ou outras substâncias interferentes. Isso requer que todos os tubos, pipetas, funis, frascos de reagentes, rolhas de borracha, etc, tornem-se livres de qualquer tipo de agente de superfície, evitando-se o emprego de desinfetantes.

Como precaução adicional, manter todo esse material em banho a  $82^{\circ}C$  no mínimo por dez minutos pouco antes do seu uso. Evitar o emprego de frascos de plástico, por causa do risco de contaminação fenólica.

O leite pasteurizado não pode ter nenhum contato com quaisquer utensílio ou equipamentos que tiveram contato com leite ou creme crus, já que estes poderão introduzir fosfatase suficiente para produzir teste positivo mesmo num leite corretamente pasteurizado.

Como cerca de 30-40% da fosfatase encontra-se adsorvida pela membrana lipoprotéica, dos glóbulos de gordura, o processo de padronização ou desnatado do leite causa a sua partição em favor do creme e da manteiga, concentrando-se nesses produtos. Conseqüentemente, a adição de creme cru a qualquer produto, produzirá resposta mais acentuada ao teste do que a adição do mesmo volume de leite.

A prática demonstra que o creme pasteurizado e com resposta negativa ao teste de fosfatase, após ter sido estocado por vários dias a  $4^{\circ}C$ , pode voltar a apresentar resposta positiva.

Isso deve ao fato de que algumas cepas de Bacillus Cereus e Bacillus mesentericus, bactérias formadoras de esporos, são capazes de produzir fosfatase. A fosfatase bacteriana é mais resistente ao tratamento térmico do que a natural do leite, suportando  $76,7^{\circ}C/30$  minutos. A presença de fosfatase bacteriana pode ser diferenciada da fosfatase alcalina do leite através do aquecimento da amostra de creme a temperaturas acima daquelas usadas para sua pasteurização lenta ( $66^{\circ}C$ ), mas abaixo de  $76,7^{\circ}C$ , com posterior realização do teste da maneira usual.

Em vista da possibilidade de formação de fosfatase microbiana, ou fenol, ambos por ação de microrganismos no creme, torna-se evidente que um teste positivo para amostras no produto estocado não pode constituir prova conclusiva de pasteurização inadequada.

A fosfatase alcalina do leite tratado pelo método HTST pode também sofrer reativação com o decorrer do tempo, devido à oxidação dos grupos sulfidrílicos da molécula. Entretanto, as temperaturas requeridas para induzir tal reativação são bastante altas ( $91^{\circ}C/16$  seg. para leite integral a  $102^{\circ}C/16$  seg. para o leite desnatado), bem como o período de incubação para que tal aconteça é excessivamente longo ( $32^{\circ}C/6$  horas para o leite integral e  $32^{\circ}C/18$  horas para leite desnatado).

O método LTLT ( $63^{\circ}C/30$  min.), por outro lado, desnatura completa e permanentemente a enzima.

Os tratamentos UHT (ex:  $141^{\circ}C/7$  seg) resultam em variados graus de reativação da fosfatase alcalina, dependendo de fatores tais como temperatura de aquecimento, período de retenção e teor de gordura do leite.

**(5) Pesquisa de Peroxidase:**

A peroxidase é uma enzima que catalisa a transferência de oxigênio de peróxidos, especialmente peróxido de hidrogênio, para outras substâncias. Qualquer tipo de leite contém peroxidase. O teor varia um pouco entre as espécies animais, mas o leite é uma das melhores fontes conhecidas, de peroxidase. Trata-se de uma heme-proteína com um teor de ferro de aproximadamente 0,07%. Seu pH ótimo é 6,8 e não sofre inativação com as temperaturas usuais de pasteurização.

No teste de peroxidase, a enzima transfere o oxigênio da água oxigenada para o guaiacol, que adquire com isso a cor salmão. Assim, uma pasteurização bem conduzida deverá preservar a peroxidase, que ao mudar a coloração do guaiacol mediante a adição de peróxido de hidrogênio, demonstrará plena atividade.

**(6) Pesquisa de Conservadores, Neutralizantes da Acidez, Detergentes, Sanitizantes e Reconstituintes da Densidade do Leite.**

**a) Conservadores** ou **conservantes** são substâncias que geralmente impedem ou retardam as alterações dos alimentos por microorganismos **ou por enzimas**.

Em leite fluido, são substâncias adicionadas **fraudulentamente**, no intuito de aumentar a vida útil do produto/matéria-prima, a exemplo do formaldeído, água oxigenada, ácido bórico, ácido salicílico, carbonatos, hipocloritos e cloraminas, ácido benzóico e bissulfitos, entre outros, além dos antibióticos e quimioterápicos.

**Alguns Efeitos Adversos à Saúde:**

- O emprego do FORMALDEÍDO provoca enrijecimento de proteínas, tornando-as menos digeríveis, além de provocar ação prejudicial sobre a mucosa gástrica e enzimas digestivas;
- A água oxigenada, nas doses empregadas para atividade antimicrobiana no leite, comunica a este um sabor estranho e adstringente;
- O ÁCIDO SALICÍLICO pode provocar vasodilatação periférica, queda da pressão arterial e da temperatura corporal, bem como inflamação do epitélio renal;
- O ÁCIDO BÓRICO acumula-se nas gorduras corporais e inativa enzimas descarboxilases;
- AS BASES DE AMÔNIO QUATERNÁRIO inativam a citocromo-oxidase e enzimas digestivas.

Normalmente se faz a suspeição da adição de conservadores ao leite se este permanecer inalterado por cerca de 24 – 36 horas em temperatura ambiente.

O emprego de substâncias conservadoras, fora a sua ação prejudicial à saúde do consumidor e a certas aplicações tecnológicas do leite em natureza, faz diminuir o interesse pela limpeza, higiene e refrigeração durante a obtenção e posterior conservação do leite.

**DICAS:**

**1. Há métodos analíticos para a pesquisa de diversos conservadores descritos na Instrução Normativa SDA MAPA nº 68/2006. Se a indústria preferir outros métodos (não oficiais), deve certificar-se de que sejam tão ou mais sensíveis do que os oficiais;**

**2. Para antibióticos, as indústrias geralmente adotam produtos disponíveis no mercado nacional, alguns dos quais são capazes de diagnosticar a presença de resíduos dessas drogas no leite em poucos minutos.**

**3. Certos “kits” para pesquisa rápida de resíduos de antibióticos podem ser usados no campo (junto aos tanques de resfriamento de leite, por exemplo). É preferível analisar o leite para antibióticos na fazenda (não recolhendo o leite com resultado positivo) do que no pátio da indústria.**

**b) Neutralizantes da acidez:** são normalmente empregados para mascarar a acidez produzida pelos microorganismos. Seu uso acarreta resultados de análises indicando baixa acidez, alto pH e teores mais elevados de sódio e lactato (esses últimos nem sempre se encontram fora de sua faixa normal). O ponto de congelamento também apresentará uma maior depressão.

Em geral, a comparação da acidez total com o teor de lactato(s) é suficiente para detectar a adição de neutralizadores. Outras técnicas envolvendo a determinação do pH das cinzas do leite, bem como a acidez titulável das cinzas solúveis e as titulações diretas do filtrado ou do centrifugado após coagulação das proteínas, podem detectar a adição de carbonatos, bicarbonatos ou hidróxidos de metais alcalinos, embora requeiram parâmetros estabelecidos a partir de leites não fraudados.

Amostras de leite podem apresentar um ponto de congelamento correto, mas um baixo teor de sólidos não gordurosos (ou extrato seco desengordurado). Isso pode significar leite genuíno, mas de baixa qualidade, possivelmente devido a animais doentes, bem como um leite que sofreu aguagem e neutralização.

Teoricamente, a adição de 0,84% de bicarbonato de sódio causa uma depressão do ponto de congelamento em 0,185°C, embora na prática seja possivelmente menor, em parte devido à ionização do ácido láctico e em parte à perda de CO<sub>2</sub> na neutralização.

**Os neutralizantes são possivelmente as substâncias que mais afetam negativamente a composição do leite, provocando:**

- **Desintegração de proteínas;**
- **Saponificação da gordura;**
- **Modificação dos fosfatos de cálcio e magnésio;**
- **Criação de ambiente favorável ao crescimento de microrganismos que poderiam ser inibidos pela acidez mais elevada.**

Cria-se um círculo vicioso com a neutralização da acidez do leite: os microrganismos presentes no material, desenvolvendo-se rapidamente num ambiente de baixa acidez, provocarão a formação de mais ácido, o que logo implicará a necessidade de nova neutralização, e assim por diante até que se consiga passar o “leite” para frente. Daí a concepção de fraudes mais sofisticadas: o emprego, junto com o neutralizante, de um conservador para inibir a proliferação microbiana, o que acarretará a “estabilização” da acidez num nível que não prejudique a comercialização do material fraudado.

**DICAS:**

**1. Há métodos analíticos para a pesquisa de neutralizadores da acidez descritos na Instrução Normativa SDA MAPA nº 68/2006. Se a indústria preferir outros métodos (não oficiais), deve certificar-se de que sejam tão ou mais sensíveis do que os oficiais;**

c) **Detergentes & Sanitizantes:** os detergentes possuem ação antimicrobiana mais ou menos pronunciada, dependendo da concentração, formulação, etc. No leite, resíduos de detergentes podem atuar como emulsificantes tornando difícil a separação da gordura.

O emprego de cloro para a sanitização de equipamentos e utensílios não apresenta efeito tóxico para o homem nas concentrações usadas para destruição de microrganismos patogênicos. A presença de resíduos de cloro no leite, provenientes de tubulações e tanques de estocagem, costuma ser facilmente detectável pelo sabor e odor.

**DICAS:**

**1. Há métodos analíticos para a pesquisa de resíduos de detergentes e sanitizantes descritos na Instrução Normativa SDA MAPA nº 68/2006. Se a indústria preferir outros métodos (não oficiais), deve certificar-se de que sejam tão ou mais sensíveis do que os oficiais;**

d) **Reconstituintes da densidade/do teor de sólidos/do ponto de congelamento:** as substâncias mais freqüentemente empregadas para essa finalidade são o cloreto de sódio (sal de cozinha), o açúcar comum ou sacarose, o amido, as dextrinas, a gelatina e as gomas. Seu emprego geralmente é feito para mascarar a adição de água ou de “soro de queijo” ao leite.

**DICAS:**

**1. Há métodos analíticos para a pesquisa de reconstituintes descritos na Instrução Normativa SDA MAPA nº 68/2006. Se a indústria preferir outros métodos (não oficiais), deve certificar-se de que sejam tão ou mais sensíveis do que os oficiais;**

**(7) Glicídios Redutores em Lactose:**

Glicídios totais é o conjunto de glicídios facilmente solubilizáveis que podem existir nos alimentos por adição ou naturalmente, como: LACTOSE, glicose, frutose, sacarose, maltose, dextrina e amido.

Sua determinação é importante para conhecer o valor nutritivo dos componentes digeríveis, para ter conhecimento da composição centesimal e conseqüente enquadramento nos padrões de alimentos.

Em determinados produtos eles podem exercer ação conservadora, de acordo com sua concentração. Exemplo: leite condensado, doce de leite.

As propriedades químicas dos açúcares dependem do poder redutor e oxidativo do seu grupamento carbonílico.

A mais importante reação dos açúcares redutores é a sua oxidação em meio alcalino. Todos os açúcares redutores têm sua cor modificada para amarelo e depois para marron por influência de um álcali.

Em meio alcalino os açúcares e as reações envolvidas são bastante complicadas, normalmente incompletas e não estequiométricas, além de não serem específicas para açúcares como tal.

Quando um açúcar redutor é tratado com álcali, forma-se uma série de produtos de degradação responsáveis pela redução dos sais de cobre.

Nas mais modernas modificações do método de redução do cobre, o azul de metileno é usado como indicador interno: em soluções alcalinas aquecidas, esse corante é reduzido por aldoses e cetoses até sua leucobase, mas essa redução não ocorre enquanto houver cobre não reduzido em solução. O descoramento é quase instantâneo e a ação do indicador é reversível, já que a adição de traços de sais de cobre restaura sua cor imediatamente.

Lane e Eynon desenvolveram em 1923 um procedimento volumétrico acurado, com base no uso azul de metileno como indicador interno para evitar erros devido à reoxidação do cobre reduzido.

Nesse método, empregam-se as soluções de Fehling (sulfato de cobre e tartarato de sódio e potássio), que devem ter seu título determinado através de uma solução padrão de glicose.

A titulação do teor de lactose deve ser realizada entre 2 e 3 minutos. O licor de Fehling pronto para análise (soluções A + B diluídas em cerca de 40 mL de água num ERLLENMEYER de 125 mL) deve permanecer sob permanente fervura; se a fervura não for permanente durante a titulação (selecionar criteriosamente a chapa ou outra fonte aquecedora!) o ar oxidará o azul de metileno, mantendo-o na coloração azul, o que facilmente induz a erro quanto ao ponto final da titulação.

Portanto, somente a prática propiciará o equilíbrio entre a velocidade da titulação (máximo de 3 minutos entre o início do gotejamento do filtrado e o descoramento do indicador até sua leucobase) e a manutenção do licor sob permanente fervura.

#### **(8) Determinação do Teor de Sólidos totais do Leite:**

O percentual de sólidos pode ser determinado por um processo de dessecação, ou seja, extraindo água do leite. Por ser este um método bastante demorado e que pode acarretar perda de sólidos, prefere-se, em geral, sua determinação por cálculo.

- *No processo de dessecação, a temperatura deve ser superior a 92°C para evitar formação de cristais de lactose-hidratada, na qual a água dificilmente se evapora.*
- *No processo por cálculo, utiliza-se a boa relação existente, de um lado, entre os sólidos e, de outro, entre o teor de gordura e a densidade. Para tanto, deve-se proceder à determinação da gordura e da densidade. Em seguida aplicam-se os dados na fórmula utilizada como oficial, que, no Brasil, é a de FLEISCHMANN:*

$$\% \text{ S.T. (m/v)} = 1,2 \text{ G} + 2,665 \times \frac{(100 \text{ D} - 100)}{\text{D}}$$

#### **(9) Determinação do Teor de Gordura:**

Sua importância decorre do fato de que o pagamento do leite ainda é feito em diversos países pelo seu conteúdo em gordura. Por outro lado, muitos produtos têm limites mínimo e/ou máximos legais para seu teor de gordura.

Atualmente são empregados métodos clássicos (Gerber, Babcock, Rose-Gottlieb) e métodos instrumentais (baseados em turbidimetria, como o Milko-Tester e o Autoanalyser; na absorção infravermelha, como o IRMA e o NIRS; na velocidade de ondas sonoras, como o Darisonômetro) para a determinação da gordura.

Os métodos de Gerber e de Babcock, apesar de largamente usados, não são exatos, necessitando sofrer padronização por um método gravimétrico tal como o de Rose-Gottlieb, que, inclusive, é recomendado pela Federação Internacional de Laticínios como método de referência (IDF, 1A: 1969).

É útil observar que, no método de Gerber, a manutenção do butirômetro por tempo prolongado no banho de água a 65°C pode levar a uma esterificação do álcool isolamílico, com conseqüente aumento no volume da camada de gordura. Isso, obviamente, causará uma superestimação do teor de gordura da amostra sob análise. Uma maneira de evitar tal erro é usar o B.M. a 40°C, centrifugar várias vezes até leitura constante e multiplicar o valor da leitura por 1,02.

ENTRETANTO, O MÉTODO OFICIAL NÃO ADMITE ESSA ALTERNATIVA!

Deve-se efetuar cuidadoso controle das rolhas dos butirômetros. As rolhas de borracha natural absorvem gordura em alguma extensão. Já as borrachas butílicas e nitrílicas são satisfatórias.

Método de GERBER:

Funções dos reagentes:

- ácido sulfúrico (d= 1,820-1,825): dissolver os sólidos não gordurosos, liberando gordura e produzindo calor suficiente para mantê-la no estado líquido;
- Álcool iso-amílico: prevenir a carbonização da gordura e proporcionar coluna límpida de gordura.

**Os pontos críticos na análise da gordura segundo GERBER são:**

- Concentração e quantidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- Controle da temperatura do B.M.;
- Velocidade de centrifugação;
- Qualidade do álcool iso-amílico.

Nessa determinação **as propriedades medidas são:**

- Componentes mais leves e insolúveis em solução forte de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- Componentes incluídos: gorduras verdadeiras (triglicerídios), alguns ácidos graxos e vitaminas, além de “impurezas” (água, material floculado, etc).

**Comparando o método Gerber com outros processos de determinação de Gordura:**

- **Milko-Tester:** mede a transmitância de luz através de uma suspensão de glóbulos de gordura (depende do número de glóbulos). Inclui a medida de todos os componentes que existam como glóbulos insolúveis em uma suspensão de versene. Pontos Críticos: tamanho dos glóbulos de gordura, calibração do instrumento
- **Infra-Vermelho Próximo:** depende do número de moléculas de gordura. Mede gordura verdadeira e fosfolípides. Pontos críticos: calibração do aparelho e tamanho dos glóbulos de gordura.
- **Mojonnier (ou Roese Gottlieb MODIFICADO):** mede componentes solúveis em éter e insolúveis em álcali diluído. Inclui gorduras verdadeiras, fosfolípides, alguns ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis, colesterol e “impurezas” (água, etc).

A homogeneização do leite provoca maior dificuldade de separação dos glóbulos de gordura, mas sem afetar o método de Gerber (igualmente não afeta o método de Mojonnier e o de Babcock modificado seg. Lucas & Trout). Pode ser necessário centrifugar mais vezes. Em comparação com o método de Mojonnier (método de referência), o teste de Gerber em leite antes e após a homogeneização apresenta, em média, resultados 0,09 % superiores.

O álcool iso-amílico é venenoso, não devendo ser pipetado. Usar um dispensador apropriado ou mergulhar a pipeta no líquido, deixando que este ascenda naturalmente pela pipeta.

As gorduras caracterizam-se por extrema insolubilidade em água e considerável solubilidade em solventes orgânicos. O sucesso da sua extração requer que as ligações entre lipídios e outros compostos sejam quebradas de modo que as gorduras sejam liberadas e solubilizadas. Normalmente tal solubilidade é atingida quando a polaridade do lipídio e a do solvente é similar. Assim, triglicerídeos apolares são dissolvidos em solventes apolares como éter de petróleo, enquanto que glicolipídios são dissolvidos em álcool.

O teste de Gerber baseia-se no mesmo princípio, diferenciando-se de Babcock quanto aos volumes da amostra e do ácido sulfúrico, além de outros detalhes.

Os fosfolipídios não estarão incluídos na gordura determinada pelos métodos de Gerber e de Babcock. Isso não tem importância em leite fluído e me creme, visto que nestes, os lipídios polares constituem cerca de 1% do total de lipídios.

Entretanto, o fato torna-se importante na análise do leiteiro, já que sua gordura contém cerca de 20% de fosfolipídios. Nesse caso é necessário recorrer a um método gravimétrico.

No teste de Roesse-Gottlieb a amostra é alcalinizada com hidróxido de amônio e, se necessário, diluída com água e aquecida para facilitar a dispersão. A mistura digerida é extraída repetidamente com etanol, éter etílico e éter de petróleo. Os extratos combinados são secados, purificados por extração com éter de petróleo. Os extratos combinados são secados, purificados por extração com éter de petróleo e pesados.

No teste de Mojonnier os extratos combinados são pesados sem purificação. Conseqüentemente, os resultados são ligeiramente superiores no teste de Mojonnier em relação ao teste de Roesse-Gottlieb.

O teste de Mojonnier, conforme se pode concluir, consiste em uma modificação do de Roesse-Gottlieb, com a vantagem de ser muito mais rápido. Esse teste é em geral aplicado para sorvete, leite evaporado, leite condensado e outros produtos lácteos nos quais a aplicação de teste de Babcock é dificultada. A rapidez que lhe é característica deve-se ao emprego de aparelhagem especial, que serve ao duplo propósito de realizar teste para o teor de gordura e para o teor de sólidos totais.

### **SIGLAS UTILIZADAS**

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

IN – Instrução Normativa

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do MAPA

### **Referência Bibliográfica:**

- Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)
- Procedimentos e Normas para Registro de Leites, Produtos Lácteos e suas Rotulagens (G-100, edição de maio/2007).

**(Elaboração e Pesquisa: G-100 e Terra Viva Consultoria)**

[g100@terraviva.com.br](mailto:g100@terraviva.com.br)

[terraviva@terraviva.com.br](mailto:terraviva@terraviva.com.br)