

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO LEITE *IN NATURA* E UHT QUANTO AO ÍNDICE DE CMP

EVALUATION OF STABILITY OF RAW MILK AND UHT MILK CONSIDERING THE LEVEL OF CMP

Maria Tereza Friedrich¹, Rafaela Barbosa Carvalho Franken², Mônia Stremel Azevedo³,
Michele Antoniuk Presta³, Carine Dall Agnol⁴

¹Instituto de Ciências Exatas e Geociências, Área de Química da Universidade de Passo Fundo – UPF, BR 285, km 171, CEP 99001-970, Passo Fundo/RS, Brasil, e-mail: friedrich@upf.br

²Pós-graduação em Análise e Controle Químico - UPF, e-mail: quimirafa@yahoo.com.br

³Centro de Pesquisa em Alimentação – Cepa- UPF, e-mail: michelepresta@gmail.com, moazevedo@gmail.com,

⁴Curso de Química Bacharelado – UPF, e-mail: carinedall@gmail.com

RESUMO

O leite é um alimento importante na alimentação humana e sua composição deve obedecer a requisitos estabelecidos por legislação específica. O acréscimo de substâncias estranhas à composição do leite representa uma fraude contra o consumidor. A presença e concentração de caseinmacropeptídeo (CMP) no leite podem, de acordo com a concentração, indicar uma adição fraudulenta de soro proveniente da produção de queijos ou indicar a sua deterioração, causada pelo desenvolvimento de microrganismos psicotróficos. A forma de estocagem, temperatura de refrigeração e o tempo de armazenamento do leite podem influenciar no grau dessa ação proteolítica. Este trabalho teve como objetivos avaliar a estabilidade das amostras de leite UHT (do inglês, Ultra-High Temperature) e *in natura*, com relação à temperatura e ao tempo de armazenamento, quanto ao índice de CMP. Os parâmetros avaliados na validação do método foram precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária, recuperação, linearidade, superposição da matriz, limites de detecção e quantificação. Todos os parâmetros avaliados foram estatística e analiticamente aceitos. As amostras foram armazenadas em diferentes condições de temperatura e por diferentes períodos. Os resultados obtidos indicaram que o leite *in natura* mantido sob refrigeração até o quarto dia de armazenamento manteve estáveis os valores do índice de CMP e até o 30 dia de armazenamento, quando mantido congelado. O leite UHT recém-processado se manteve estável até o quarto dia de processamento; após este período a concentração do índice de CMP aumentou progressivamente até 50º dia. Considerando tais aspectos, para que se tenha confiabilidade nos resultados analíticos, o tempo e as condições de armazenamento da amostra devem ser rigorosamente controlados.

Palavras-chave: CMP. Adulteração em leite. Cromatografia por exclusão.

ABSTRACT

Milk is an extremely important food product and its composition must obey specific criteria set by legislation. The addition of a foreign substance to the milk composition represents a fraud against the consumer. The presence and concentration of caseinmacropeptide (CMP) in milk can, in accordance with the concentration, indicate a fraudulent addition of whey proceeding from the production of cheeses or indicate the deterioration caused by the growth of psychrotrophic bacteria. The way of storage, the temperature of refrigeration and the storage time of milk can influence in the degree of deterioration by the proteolytic action of the bacteria. This work aims at evaluate the influence of temperature and time of storage on samples of Ultra-High Temperature (UHT) milk and raw milk considering the CMP levels. The parameters tested in the validation of this method are precision, considering the repeatability and intermediate precision, recovery, linearity, matrix-matched, limit of detection and limit of quantification and all parameters are statistically and analytically accepted. The samples were conditioned in different temperature and time of storage. The results demonstrate that in cooled raw milk the levels of CMP are stable until day four and up to 30 days under frozen conditions. The fresh processed UHT milk was stable until day four and after this period the concentration of CMP increased gradually until the 50th day. Considering these observations, the time of storage and temperature needs to be rigorously controlled to have reliable analytical results.

Keywords: CMP. Milk adulteration. Size exclusion chromatography.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de leite na alimentação humana é essencial, sendo um produto cujas funções nutricionais são extremamente benéficas à saúde. Por este motivo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) estabelece parâmetros para que o controle deste produto seja feito com qualidade, buscando um produto próprio para o consumo. (BRASIL, 2006).

O soro é um subproduto da fabricação de queijos que representa 85-90% do volume de leite utilizado e retém em torno de 55% dos nutrientes do leite, sendo um ingrediente normal e de uso tecnológico consagrado em inúmeros alimentos. (GONZÁLES SISO, 1996). No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento desse soro. A maior parte deste volume, entretanto, não é reaproveitada pela indústria, tampouco pelo pequeno produtor. Na tentativa de não descartar esse subproduto como resíduo, ocorre a reutilização do soro adicionando-o ao leite a ser comercializado. O objetivo maior dessa incorporação no leite é aumentar o seu volume, caracterizando-se, assim, como fraude econômica. Por isso, não existe permissão legal para a sua adição ao leite.

De acordo com Antunes (2003), a separação das caseínas do leite, seja na produção de queijos, seja na fabricação de caseína, dá origem às proteínas do soro, muitas vezes denominadas proteínas do soro de queijo. Entretanto, a nomenclatura proteínas do soro de leite bovino é mais correta, uma vez que se originam do leite, não do queijo.

O termo CMP é frequentemente referido como glicomacropéptido (GMP). Segundo Amiot et al. (1991), como algumas k-caseínas não possuem carboidratos, torna-se mais correta a denominação caseinomacropéptido (CMP). O termo CMP será usado no presente trabalho.

A iniciativa deste trabalho justifica-se pela necessidade da avaliação contínua da qualidade do leite comercializado e consumido pela população, evitando uma fraude econômica, ou qualquer tipo de adulteração que possa prejudicar os consumidores.

A Instrução Normativa (IN) nº 68 de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos, dentre os quais está estabelecido o método de detecção e quantificação do índice de CMP para determinação da adulteração do leite por adição do soro de queijo. (BRASIL, 2006a).

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Tratamento das amostras

Foram utilizadas amostras de leite *in natura* e leite UHT. A amostra de leite *in natura* foi coletada no Centro de Pesquisas Agropecuárias da Universidade de Passo Fundo. O leite UHT recém-processado foi fornecido pela empresa Bom Gosto, lote LC 170600.

Para o estudo da estabilidade do leite com relação ao tempo e à temperatura dividiu-se a amostra de leite *in natura* em duas partes: a primeira parte foi acondicionada em sete potes plásticos fechados, mantidos sob refrigeração entre 3 °C e 8 °C; a segunda parte, em oito potes plásticos fechados, os quais foram mantidos congelados por um período de 33 dias. Foram avaliadas amostras do leite UHT armazenadas à temperatura ambiente durante cinquenta dias, sendo utilizada para cada análise utilizada uma nova embalagem desse leite.

As amostras que estavam congeladas, antes de serem analisadas, foram inicialmente colocadas no refrigerador e posteriormente deixadas no laboratório, em repouso, até atingirem temperatura ambiente. Após atingirem a condição analítica adequada, pipetou-se para um becker uma alíquota de 10 mL da amostra e adicionaram-se 5,0 mL de ácido tricloroacético a 24% gota a gota, sob agitação constante. Deixou-se o sistema em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente, filtrou-se e injetou-se no cromatógrafo líquido.

Todas as amostras foram analisadas no laboratório de Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentação (Cepa) na UPF, sendo os ensaios realizados em triplicata.

2.2 Preparo da curva analítica

Preparou-se uma solução primária de CMP na concentração de 1000 mg L⁻¹ em água. Após, retirou-se uma alíquota dessa solução para a solução secundária de CMP na concentração de 100 mg L⁻¹, completando-se o volume com água Milli-Q[®]. A partir disso foram preparadas cinco soluções analíticas de CMP, que correspondem aos pontos da curva de 10 mg L⁻¹ a 90 mg L⁻¹ em leite *in natura*.

2.3 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido S200 PUMP (Perkin Elmer) equipado com: amostrador automático, detector de ultravioleta e *software*. As condições cromatográficas utilizadas nas análises foram as seguintes: coluna cromatográfica hidrofílica para separação de macromoléculas por filtração em gel (partículas de sílica esféricas com diâmetro nominal de 4 a 4,5 µm, superfície modificada estabilizada com zircônio, diâmetro de poro 150 Å, área superficial 140 m² g⁻¹, camada hidrofílica mono molecular tipo diol), com 9,4 mm de diâmetro e 250 mm de comprimento da coluna (similar a Zorbax GF 250 Bioséries da Agilent). O volume de amostra injetado no cromatógrafo foi de 20 µL; a fase móvel utilizada foi solução tampão fosfato pH 6,0 na vazão de 0,7 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 210 nm.

2.4 Armazenamento da coluna

Após o uso a coluna foi lavada com água Milli-Q[®] por 2 horas e armazenada sob refrigeração.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Critérios para interpretação dos valores referentes ao Índice de CMP

O Mapa, através da IN n.º 69, estabelece os seguintes critérios para a interpretação dos valores referentes ao índice de CMP encontrados nas análises.

Art. 2º - Somente quando o índice de CMP for de até 30 mg L⁻¹, o leite de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa poderá ser destinado ao abastecimento direto.

§ 1º Quando o índice de CMP do leite estiver entre 30 mg L⁻¹ e 75 mg L⁻¹, este poderá ser destinado à produção de derivados lácteos.

§ 2º Os derivados lácteos de que trata o § 1º serão avaliados tecnicamente, caso a caso, pelo DIPOA.

§ 3º Quando o índice de CMP do leite estiver acima de 75 mg L⁻¹, este poderá ser destinado à alimentação animal, à indústria química em geral ou a outro destino a ser avaliado tecnicamente, caso a caso, pelo DIPOA (BRASIL, 2006b).

3.2 Estudo da estabilidade do leite frente à temperatura e tempo de armazenamento

Os resultados obtidos nas análises das amostras de leite *in natura* resfriado e congelado e leite UHT, referentes à avaliação da sua estabilidade em diferentes temperaturas e tempo de armazenamento, são apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 1. Resultados das determinações de CMP em leite *in natura* resfriado em função do tempo.

Tempo de armazenamento (dias)	Concentração (mg L ⁻¹)	Desvio-Padrão (%)
0	5,40	0,98
1	8,78	1,28
4	12,66	2,84
6	143,97	2,74
8	344,48	51,78
11	982,49	29,24

n= 3

Os resultados na tabela 1 (n= 3, análises realizadas em triplicata) mostram que o leite, até o quarto dia, apresenta uma concentração de CMP de até 12 mg L⁻¹. A partir desse tempo de armazenamento ocorre um aumento significativo dessa concentração acima da faixa linear do método validado. Esses dados indicam que o leite fresco apresenta, naturalmente, um baixo índice de CMP, o qual aumenta de acordo com o tempo em que é armazenado sob refrigeração. A presença de CMP no leite cru refrigerado pode ocorrer em função do sistema proteolítico do próprio leite. Lorenzetti (2006) observa que, quanto maior o tempo de armazenamento do leite resfriado, maiores as chances de multiplicação microbiana, em especial dos microrganismos psicrótrófos. Geralmente, esta microbiota se torna predominante no leite resfriado após dois ou três dias. Uma importante característica dos psicrótrófos comumente encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Por isso, as proteases produzidas por bactérias psicrótrófas agem sobre a caseína de forma semelhante à quimosina, liberando o CMP. (LORENZETTI, 2006).

Tabela 2. Resultados das determinações de CMP em leite *in natura* congelado em função tempo.

Tempo de armazenamento (dias)	Concentração (mg L ⁻¹)	Desvio-Padrão (%)
1	6,53	1,49
4	7,95	1,63
6	4,54	1,64
8	11,31	1,07
11	6,19	0,89
15	7,58	0,91
29	6,19	2,67
33	9,23	10,3

n= 3

Os resultados das análises do leite *in natura* (Tabela 2) congelado mostraram que, num período de 33 dias, a concentração de CMP variou no intervalo de 6,0 e 11,31 mg L⁻¹, evidenciando que, no período estudado, não houve um aumento do índice de CMP acima do permitido pela legislação para utilização direta do leite. Pode-se afirmar, com base nesses resultados, que o congelamento interfere na ação proteolítica do leite em comparação à primeira parte da amostra, mantida sob refrigeração. As amostras congeladas podem ser submetidas à determinação de CMP por um período de até trinta dias após a coleta, se forem mantidas congeladas (temperatura < 10 °C).

Tabela 3. Resultados das determinações de CMP em leite UHT em função do tempo.

Tempo de armazenamento (dias)	Concentração (mg L ⁻¹)	Desvio-Padrão (%)
0	15,15	1,54
1	14,79	1,38
4	29,87	1,42
6	45,06	1,02
8	41,85	0,54
12	52,36	6,96
21	89,38	5,62
25	91,85	2,35
28	105,76	4,97
49	182,06	5,79

n= 3

Os resultados das análises (Tabela 3) mostraram que o leite UHT apresentava, no dia em que foi processado, um índice de CMP de 15,15 mg L⁻¹. Após o quarto dia, a concentração de CMP era de aproximadamente 45,0 mg L⁻¹, aumentando progressivamente ao longo dos dias. Esses dados mostram que, mesmo com o processo de ultra-alta temperatura, há a ocorrência de proteólise no leite durante o tempo de vida de prateleira. Muitas bactérias psicotróficas produzem proteinases e lipases estáveis ao calor capazes de sobreviver aos tratamentos térmicos comerciais ainda que as bactérias produtoras dessas enzimas sejam destruídas. Mesmo em baixa concentração, essas enzimas são capazes de produzir lipólise e proteólise em leite e seus derivados. (FUKUDA, 2003).

De acordo com Fukuda (2003), as proteinases psicotróficas hidrolisam a caseína na ligação 105-106, levando à formação de CMP. Desse modo, a presença de CMP em leite UHT pode não ser considerada exclusivo indicador de adulteração do leite com soro.

Tendo como referência esses critérios, torna-se extremamente importante o controle do intervalo de tempo entre a ordenha e o dia da análise, bem como da forma da coleta, da conservação e envio da amostra ao laboratório.

Para que se tenha garantia de um resultado confiável na determinação da concentração de CMP no leite, deve-se coletar leite fresco recém-ordenhado em frasco limpo, que evite vazamentos. Em seguida, a amostra deve ser congelada e mantida nessas condições até ser preparada para análise no laboratório. O tempo de envio após a coleta do leite *in natura* deve ser, no máximo, de quatro dias, devendo o cliente informar a data da coleta, e as condições de armazenamento.

O leite para ser processado na indústria deve apresentar uma concentração de até 30 mg L⁻¹ de CMP, limite estabelecido pelo Mapa. Além disso, é muito importante que as análises especifiquem as condições da amostra, como o tempo de processamento, pois, quando realizadas em condições não adequadas podem gerar resultados que levem a interpretações falsas sobre as condições do leite.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo estabelecem critérios extremamente importantes para a determinação do índice de CMP em leite, bem como para a interpretação dos resultados encontrados.

Neste estudo foi observado que tanto para as amostras de leite UHT como para leite *in natura* refrigerado, mesmo partindo de leite cru fresco e leite UHT recém-processado, foram encontradas baixas concentrações de CMP nos primeiros dias de análise, as quais aumentaram de acordo com o tempo de armazenamento.

Dessa forma, não se pode afirmar que este composto não se apresenta naturalmente no leite. Além disso, pode-se verificar que a proteólise foi progressiva durante todo esse período, sendo o

principal indicador do aumento dos níveis de CMP. Isso indica que nem sempre uma concentração de CMP acima de 30 mg L^{-1} , valor estabelecido pelo Mapa, representa que o leite foi adulterado por adição de soro.

Outro fator relevante nesse estudo é o fato de que na amostra de leite congelado a concentração de CMP não apresentou grandes variações, mantendo-se estável em todo o tempo de armazenamento, indicando que o congelamento auxilia na conservação da integridade da amostra.

Considerando tais aspectos, para que se tenha confiabilidade nos resultados, os procedimentos de armazenamento e preparo da amostra devem ser realizados adequadamente, respeitando-se o tempo máximo estabelecido para o dia da análise.

REFERÊNCIAS

AMIOT, J. *Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones*. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia, 1991. 543p.

ANTUNES, J. *Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino*. Barueri, SP: Manole, 2003. 150p.

BRASIL. *Instrução Normativa SVS/MS nº 51/200*. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2002.

_____. *Instrução Normativa SVS/MS nº 68/2006*. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006a.

_____. *Instrução Normativa SVS/MS nº 69/2006*. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006b.

FOSCHIERA, J. L. *Indústria de laticínios: industrialização do leite, análises, produção de derivados*. Porto Alegre: Suliani Editografia, 2004. 88p.

FUKUDA, S. P. *Estudo da correlação entre o método da ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite*. 2003. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GONZALÉZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, v. 57, p. 1-11, 1996.

KAWAKAMI, H. et al. Determination of k-casein glycomacropéptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchwissenschaft*, v. 47, p.688-693, 1992.

LÉONIL, J.; MOLLÉ, D. A method for determination of macropéptide by cation-exchange fast protein chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. *Journal of Dairy Research*, v.58, p.321-328, 1991.

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

ANEXO A – Exemplo de cromatograma obtido na análise de CMP em leite

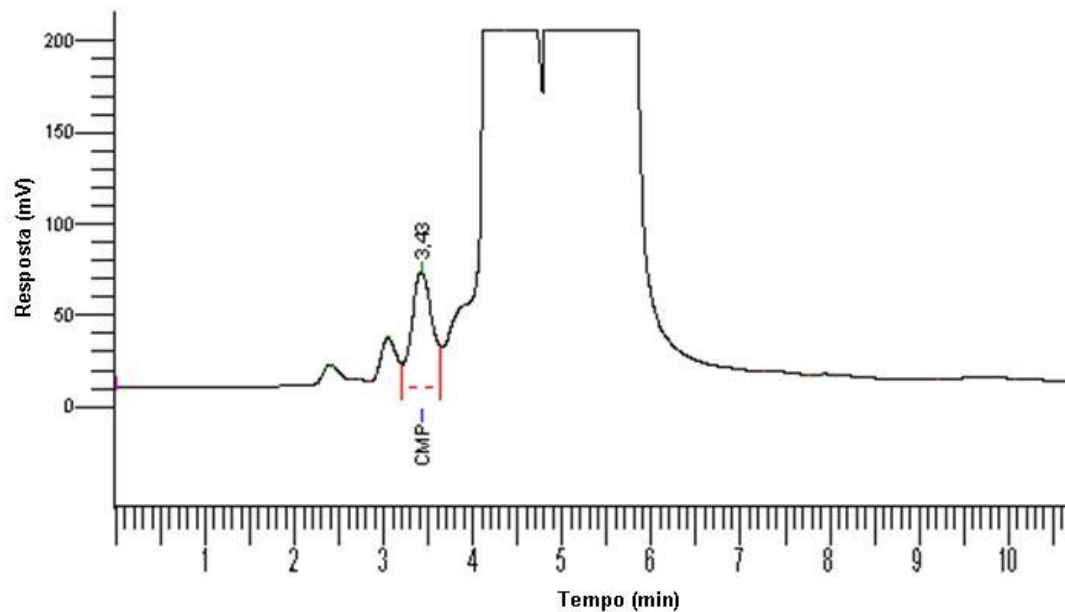


Figura 1. Cromatograma obtido na análise de CMP em leite, utilizando cromatografia por exclusão por tamanho, e as condições descritas no item 2.