

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETECÇÃO DE MALTODEXTRINA EM LEITE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETECTION OF MALTODEXTRIN IN MILK BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

Káren B. De Paula¹, Renata da Rocha², Delton Luiz Gobbi³

¹Acadêmica do Curso de Especialização em Análise e Controle Químico, Instituto de Ciências Exatas e Geociências, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo – RS, Brasil. E-mail: karen_gdk@hotmail.com

²Técnica do Laboratório de Cromatografia, CEPA, Universidade de Passo Fundo, Brasil. E-mail: renata@upf.br

³Docente do Instituto de Ciências Exatas e Geociências da Universidade de Passo Fundo. E-mail: gobbi@upf.br.

Resumo

O leite tem como principal função além do alimento, proteção contra as toxinas e inflamações do aparelho digestivo. É considerado o alimento mais completo da natureza. No Brasil muitos casos de adulteração no leite ocorre porque não há um monitoramento eficaz. As formas mais comuns de adulteração é a adição de água, o soro de queijo, hidróxido de sódio e reconstituintes, tal como a maltodextrina. A maltodextrina é utilizada para mascarar as deficiências de leite. A validação do método oficial para a determinação da maltodextrina MAPA em amostras de leite, por meio da técnica de cromatografia de camada fina, foi aceito em 100% de repetibilidade e reprodutibilidade.

Palavras-chave: validação, leite, maltodextrina.

Abstract

The milk has as main function beyond food, protection against toxins and digestive tract inflammations. It is considered the most complete food in nature. In Brazil many cases of adulteration in milk occurs because there is no effective monitoring. The most common form of adulteration is the addition of water, cheese serum, sodium hydroxide and restoratives, such as maltodextrin. Maltodextrin is used to mask the deficiencies of milk. The validation of the official method for the determination of the MAPA maltodextrin in milk samples by the technique of thin layer chromatography, was accepted at 100% repeatability and reproducibility.

Keywords: validation, milk, maltodextrin.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos cinco maiores produtores de leite do mundo, produzindo cerca de 25 milhões de toneladas de leite por ano. Sendo assim, esperava-se que a fiscalização de sua produção fosse eficiente. No entanto, as estatísticas nos mostram uma realidade bem diferente, onde de cada três litros de leite produzidos, um não passa pelo processo de inspeção. Como se já não bastasse, ainda há um problema muito mais importante do que a falta de inspeção, a adulteração do leite.¹

As práticas de fraude e adulteração são proibidas pela legislação brasileira, por diluir o teor de gorduras e proteínas do leite, reduzindo assim, o seu valor nutritivo. Este tipo de prática acaba lesando os direitos do consumidor, que se consumir o produto por um longo período, pode acabar tendo problemas de saúde, como desnutrição. Caso que fica mais grave se os consumidores forem lactentes, ou seja, crianças de zero até dois anos de idade. As quais necessitam dos nutrientes do leite. Além de prejuízos nutricionais as fraudes e adulterações também geram prejuízos econômicos.²

No Brasil, o órgão responsável por regulamentar os métodos analíticos físico-químicos para a detecção de maltodextrina em leite é Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa SDA nº 14, de 27 de abril de 2007.³

Os locais mais comuns onde se pode encontrar a prática de adulteração de leite são: no produtor de leite, no transporte, na indústria e no comércio. Segundo Brandão, existem várias formas de adulteração em leite sendo as mais comuns, a adição de água, soro de queijo, hidróxido de sódio, adição de conservantes, reconstituintes e neutralizantes, entre outros.⁴ Entre os reconstituintes encontra-se a maltodextrina, que é um dos produtos da hidrólise do amido.²

As maltodextrinas $((C_6H_{10}O_5)_nH_2O)$ são basicamente uma mistura de sacarídeos, com ampla distribuição de massa molar, entre oligossacarídeos e polissacarídeos.² A Figura 1 mostra a estrutura molecular da maltodextrina. A utilização de maltodextrinas começou nos últimos 40 anos, e desde meados da década de 1980 elas têm recebido atenção considerável no desenvolvimento de produtos de gorduras e calorias reduzidas.⁵

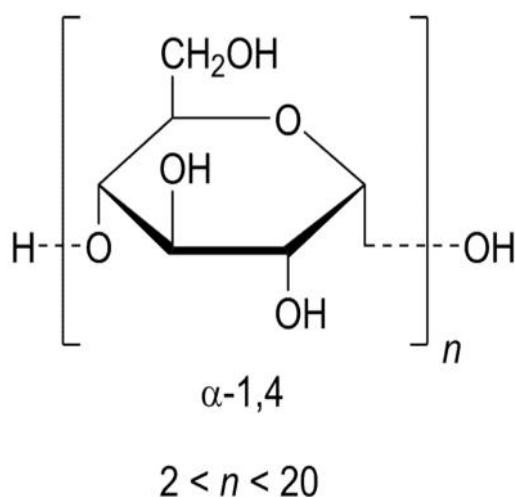


Figura 1. Estrutura molecular da maltodextrina.

Algumas das principais aplicações da maltodextrina na indústria de alimentos é na formulação de molhos para saladas, recheios, molhos, bebidas de reidratação, produtos lácteos (incluindo as

sobremesas congeladas), análogos de carne, produtos de panificação como bolos, tortas e salgados, embutidos, produtos de confeitaria, no encapsulamento de sabores e corantes, e em uma variedade de outros produtos específicos.^{6,5}

A qualidade do leite consumido pela população brasileira é uma grande preocupação das autoridades da área de saúde. A legislação mundial, e também a nacional, proíbe qualquer tipo de fraude ou adulteração no leite. As fraudes podem ser divididas em dois grupos. Sendo o primeiro grupo relativo as fraudes de caráter econômico, que se caracteriza pela adição de substâncias que aumentem o volume do leite, mas que não causem mal à saúde. Por exemplo, adição de água e soro, além da fraude de classificação do tipo do leite. Já o segundo tipo diz respeito às fraudes sanitárias, que são caracterizadas pela adição de substâncias estranhas ao leite, usadas para “esconder” as deficiências do produto, podendo algumas destas causar danos à saúde. Por exemplo, adição de soda cáustica (hidróxido de sódio), de reconstituintes, etc.^{2,4}

Portanto, além de prejuízos nutricionais as fraudes e adulterações também geram prejuízos econômicos. Por estes motivos torna-se importante a validação de métodos analíticos capazes de identificar a presença de substâncias adulterantes no leite.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico: maltose (Inlab), lactose (Himedia), sacarose (Synth). A maltodextrina foi comprada em farmácia de manipulação, com registro de qualidade. Os reagentes utilizados na fase móvel, da cromatografia em camada delgada, foram todos graus cromatográficos: acetonitrila (Merck), 1-propanol (Merck) e acetato de etila (Merck). Foi utilizada como solução reveladora α -naftol (Dinâmica), ácido sulfúrico (Dinâmica) e álcool etílico (Dinâmica). O hexacianoferrato (II) de potássio (Neon) e o sulfato de zinco (Nuclear) foram utilizados na preparação das amostras e as placas cromatográficas foram de sílica gel 60 20 x 20 cm (Merck).

2.1.2. Preparo das soluções padrão

As soluções padrões de maltose, lactose, sacarose e maltodextrina de 0,500 g 100 mL⁻¹ foram preparadas, dissolvendo 500 mg de cada carboidrato em água de osmose reversa, e completado com a mesma água de osmose, o volume do balão volumétrico de capacidade de 100 mL. Estas soluções foram mantidas por 30 dias na temperatura de 4 °C.

2.1.3. Preparo de outras soluções

As soluções de sulfato de zinco e hexacianoferrato (II) de potássio foram preparadas em água de osmose reversa, nas concentrações de 30% e 15%, respectivamente. A solução reveladora foi preparada dissolvendo-se 1g de α -naftol em 200 mL de álcool etílico e acrescentando-se em seguida

10 mL de ácido sulfúrico concentrado. A fase móvel foi preparada adicionando-se 85 mL de acetonitrila, 20 mL de acetato de etila, 50 mL de 1-propanol e 65 mL de água de osmose reversa.

2.1.4 Preparo de amostras

Foram coletados dois tipos de amostras, de leite fluído (cru, UHT e pasteurizado) e leite em pó integral. As amostras coletadas eram de diferentes marcas e diferentes lotes para cada marca. As mesmas foram coletadas aleatoriamente em supermercados da cidade de Passo Fundo. Para as amostras de leite fluído (cru, UHT e pasteurizado) foram adicionados 100 mL de leite, em um béquer de 250 mL. Em seguida, foram acrescentados 5 mL de solução de hexacianoferrato (II) de potássio a 15% sob agitação. Após foram adicionados 5 mL de solução de sulfato de zinco a 30%. Depois de completamente homogeneizada a solução ficou em repouso até a decantação completa dos sólidos suspensos. Após a decantação, a solução foi então, filtrada em papel filtro e armazenada em um béquer de 100 mL.

Para as amostras de leite em pó integral foram medidas 13 g de leite em um béquer de 250 mL, após foram acrescentados 100 mL de água de osmose e a solução foi agitada com o auxílio de um agitador magnético até completa dissolução. Em seguida, foram adicionados 5 mL de solução hexacianoferrato (II) de potássio 15% e 5 mL de solução sulfato de zinco a 30%, sob agitação.

Depois de homogeneizada e deixada em repouso para decantar, a solução foi filtrada em papel filtro e armazenada em um béquer de 100 mL.

O branco foi preparado da seguinte maneira: em um béquer de 250 mL, foram adicionados 100 mL de leite fluído isento de maltodextrina e açúcares (maltose e sacarose). Após foram acrescentados 5 mL de solução de hexacianoferrato (II) de potássio a 15% e homogeneizados com agitador magnético. Em seguida, adicionou-se 5 mL solução de sulfato de zinco a 30%. Depois de homogeneizada e decantada a solução foi filtrada em papel filtro e armazenada em um béquer de 100 mL. Para ter certeza de que o leite, utilizado como branco, estava isento de maltodextrina e açúcares, foi realizada a coleta deste leite *in natura* no Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO).

2.2 Equipamentos

Foi utilizado um agitador magnético (Quimis), uma balança analítica (Sartorius), uma estufa (Orion 520) e um secador de cabelo. Conjunto para cromatografia em camada delgada, com a cuba cromatográfica e base de aplicação, além de uma bandeja de plástico, onde as placas cromatográficas eram imersas na solução reveladora.

2.3 Método

Foi utilizado para a validação, o método analítico físico-químico, para detecção de maltodextrina em leite, oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este método utiliza a Cromatografia em Camada Delgada para detectar a presença da maltodextrina como adulterante em leite. Esta técnica cromatográfica é aplicada na identificação de dissacarídeos e oligossacarídeos. Utilizando-se solventes e reveladores apropriados, ela possibilita a detecção através

da eluição das manchas na camada delgada, determinando assim, colorimetricamente a presença ou ausência dos carboidratos de interesse.

Os dissacarídeos e oligosacarídeos presentes em amostras podem ser identificados qualitativamente pela comparação dos valores de fatores de retenção (R_f), dos padrões aplicados na placa cromatográfica. Como citado anteriormente, a solução reveladora utilizada será o α -naftol em etanol e ácido sulfúrico. A desidratação dos dissacarídeos e oligosacarídeos, seguida da condensação com o α -naftol, fornecerá um composto de coloração violeta ou marrom, com composição incerta. Isto dependerá da massa molar e da estrutura tridimensional do oligossacarídeo em questão.

2.3.1 Preparo da placa cromatográfica

Foram marcados, com auxílio de um lápis, na placa cromatográfica 9 pontos equidistantes a 3 cm da extremidade inferior da placa, identificando cada ponto onde serão aplicadas as amostras. Em seguida, foi marcado também o final da corrida cromatográfica, em torno de 18 cm da extremidade inferior da placa.

2.3.2 Aplicação das amostras

Em cinco pontos foram aplicados 3 μ L de branco, lactose, maltodextrina, maltose e sacarose, respectivamente. Utilizou-se um secador de cabelo para secar a placa, evitando assim que o diâmetro das aplicações ultrapassasse 5 mm. Em seguida foram aplicadas as amostras preparadas e já filtradas.

2.3.3 Preparo da cuba cromatográfica e revelação

Adicionou-se um volume suficiente de fase móvel para a realização da corrida, em seguida, a cuba foi tampada. A solução permaneceu na cuba por, no mínimo, 60 minutos para entrar em equilíbrio. Após o tempo de equilíbrio, a placa cromatográfica contendo as amostras e os padrões, foi inserida na cuba cromatográfica. A placa cromatográfica permaneceu em contato com a fase móvel, até a marca feita para o final da corrida ser alcançada, cerca de duas horas. Após o término da corrida, a placa foi removida e colocada para secar em estufa à 60 °C por cerca de 15 minutos.

A partir do momento em que a placa cromatográfica estava seca, esta foi então imersa completamente em uma bandeja contendo a solução reveladora, até que ficasse toda molhada. A placa foi retirada imediatamente, e secada com auxílio do secador de cabelo. Em seguida, levou-se a placa para secar em estufa à 120 °C por cerca de 20 minutos, ou até que as manchas características da reação do α -naftol com os açúcares aparecessem. Após estes procedimentos, os fatores de retenção foram calculados. Os resultados das amostras foram expressos como positivo ou negativo, para a presença de maltodextrina.

2.4 Validação

A validação do método foi feita através dos parâmetros de repetitividade e reprodutibilidade para ensaios qualitativos. Segundo Albano, nem sempre é simples visualizar a aplicação dos conceitos de repetitividade e reprodutibilidade em ensaios qualitativos, mas é possível fazer uma avaliação de

ensaios que apresentem uma resposta binária, como presença ou ausência, positivo ou negativo, etc.⁷ Por esta razão, o seguinte roteiro para o cálculo foi utilizado:

- Foram preparadas três rodadas com sete amostras para avaliar a repetitividade e reprodutibilidade de um fator, no caso diferentes analistas;
- Os ensaios foram realizados nas diferentes rodadas em ordem aleatória;
- As diferenças encontradas foram analisadas e comparadas com os critérios estipulados;
- A reprodutibilidade foi avaliada nas três rodadas
- Desta maneira, pode-se avaliar a reprodutibilidade do método através da média dos resultados conformes das três rodadas;
- A repetitividade foi analisada avaliando-se a concordância dos resultados obtidos pelos diferentes analistas, nas diferentes rodadas;
- Para que o critério fosse atendido, o resultado deveria ser 100% de concordância entre os resultados obtidos pelos diferentes analistas;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método analítico para detecção de maltodextrina em leite proposto pelo MAPA mostrou-se satisfatório ao ser implementado no Laboratório de Cromatografia. Os resultados encontrados na corrida realizada com os padrões de maltodextrina, maltose, sacarose e lactose, na concentração de 0,5%, encontram-se na Figura 2. A sacarose e a maltodextrina, apresentaram os maiores Fatores de Retenção (Rf), sendo o valor de 0,73 para ambas. A sacarose foi o açúcar que melhor se separou na placa cromatográfica. A simetria da mancha da sacarose foi quase perfeita, e sua identificação em relação à maltose, lactose e maltodextrina é bem caracterizada.

A lactose, um açúcar natural no leite, apresentou menor valor de Rf (0,64). O branco, que é o leite cru, apresentou a mesma mancha e a mesma simetria do padrão de lactose. A maltose também apresentou uma mancha com boa simetria, mas Rf (0,69) menor que a sacarose. A separação cromatográfica da maltose é muito próxima da lactose. Como era de se esperar, a separação da maltodextrina é bastante complexa, uma vez que ela é uma mistura complexa e variável de dissacarídeos e oligosacarídeos. Sua separação deixa um rastro na placa cromatográfica de fácil identificação, e uma mancha muito forte na linha de base. Pode ser esta mancha utilizada como referência para o cálculo do Rf.

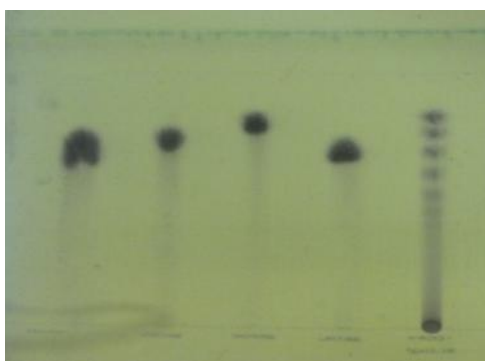


Figura 2. Corrida cromatográfica de uma placa com os padrões de maltodextrina, maltose, lactose e sacarose.

Tabela 1. Resultados obtidos para as amostras de leite fluído

	Amostra	Resultado obtido (Positivo ou Negativo)
Leite Cru	1	Negativo
	2	Negativo
	3	Negativo
	4	Negativo
	5	Negativo
	6	Negativo
	7	Negativo
	8	Negativo
	9	Negativo
	10	Negativo
	11	Negativo
	12	Negativo
	13	Negativo
	14	Negativo
	15	Negativo
	16	Negativo
	17	Negativo
	18	Negativo
	19	Negativo
	20	Negativo
	21	Negativo
	22	Negativo
	23	Negativo
	24	Negativo
	25	Negativo
Leite Pasteurizado	1	Negativo
	2	Negativo
	3	Negativo
Leite UHT	1	Negativo
	2	Negativo
	3	Negativo
	4	Negativo
	5	Negativo
	6	Negativo

Fonte: Dados Primários.

*Para as amostras de leite pasteurizado e UHT foram realizadas corridas em duplicatas, já para as amostras de leite cru foi realizada apenas uma corrida devido a pouca quantidade de amostra recebida.

Os resultados obtidos para a detecção de maltodextrina em leite fluído e em leite em pó integral se encontram nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Sempre no mesmo dia, adicionando os

padrões de um lado da placa, e do outro lado as amostras, podemos comparar, e identificar positivo ou negativo, a presença de maltodextrina nas amostras de leite. Uma mancha muito forte em todas as amostras de leite, é identificado como sendo a lactose, presente naturalmente em todas as amostras. Em todas as amostras de leite fluido e leite em pó, não foram identificados adição de maltodextrina, sacarose, e maltose, de acordo com o método.

Tabela 2. Resultados obtidos para as amostras de leite em pó integral

Amostras	Resultados obtidos (Positivo ou Negativo)
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo

Fonte: Dados Primários.

As Figuras 3 e 4 mostram placas cromatográficas com as corridas de leite em pó integral e leite cru, respectivamente.

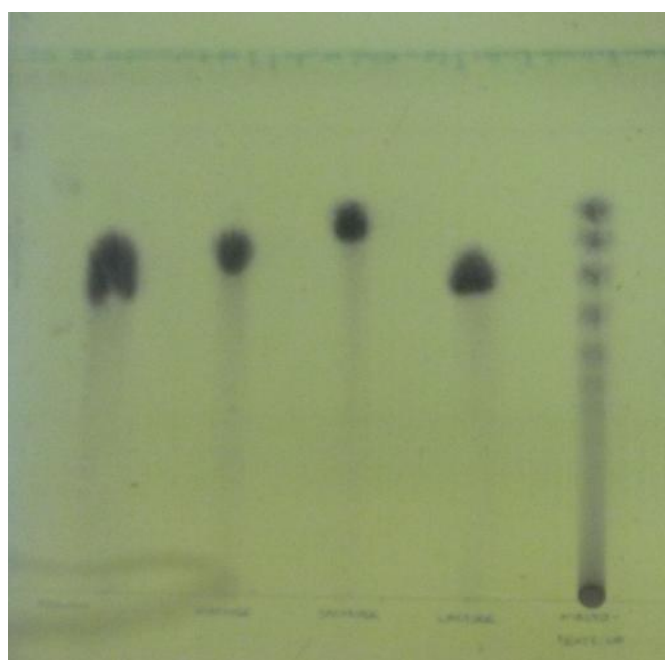


Figura 3. Corrida cromatográfica de amostras de leite em p.ó

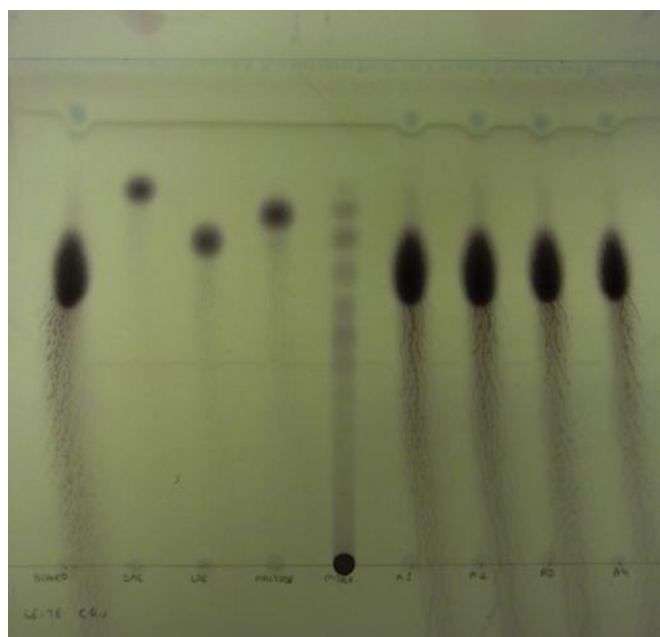


Figura 4. Corrida cromatográfica de amostras de leite cru.

3.1 Validação do método

Os resultados obtidos nas três rodadas de corridas cromatográficas para avaliar a repetitividade e a reprodutibilidade do método se encontra na Tabela 3 e 4. Para os resultados de repetitividade e reprodutibilidade, foram utilizados amostras de leite *in natura* analisadas anteriormente e sem a presença de maltodextrina. Então na primeira rodada, 7 alíquotas deste leite foram analisadas.

Em algumas alíquotas, foi feita uma adição padrão (contaminação) de maltodextrina, de acordo com as concentrações recomendadas pelo método. As 7 amostras então foram preparadas por 2 analistas diferentes, e os resultados obtidos na primeira rodada apresentaram boa reprodutibilidade e repetitividade, com 100% de concordância. As amostras contaminadas e não contaminadas foram feitas em ordem na primeira rodada.

Tabela 3. Resultados encontrados na primeira rodada de corridas cromatográficas

Analista 1				Analista 2		
	Amostras	Resultados		Amostras	Resultados	
Primeira Rodada	1	não contaminada	Negativo	1	não contaminada	Negativo
	2	contaminada	Positivo	2	contaminada	Positivo
	3	não contaminada	Negativo	3	não contaminada	Negativo
	4	contaminada	Positivo	4	contaminada	Positivo
	5	não contaminada	Negativo	5	não contaminada	Negativo
	6	contaminada	Positivo	6	contaminada	Positivo
	7	não contaminada	Negativo	7	não contaminada	Negativo

Fonte: Dados Primários.

Tabela 4. Resultados encontrados na segunda e terceira rodada de corridas cromatográficas

Analista 1				Analista 2		
	Amostras	Resultados		Amostras	Resultados	
Segunda Rodada	1	contaminada	Positivo	1	não contaminada	Negativo
	2	não contaminada	Negativo	2	não contaminada	Negativo
	3	não contaminada	Negativo	3	contaminada	Positivo
	4	contaminada	Positivo	4	contaminada	Positivo
	5	não contaminada	Negativo	5	não contaminada	Negativo
	6	contaminada	Positivo	6	não contaminada	Negativo
	7	não contaminada	Negativo	7	contaminada	Positivo
Terceira Rodada	1	contaminada	Positivo	1	não contaminada	Negativo
	2	contaminada	Positivo	2	contaminada	Positivo
	3	não contaminada	Negativo	3	não contaminada	Negativo
	4	não contaminada	Negativo	4	não contaminada	Negativo
	5	contaminada	Positivo	5	contaminada	Positivo
	6	não contaminada	Negativo	6	contaminada	Positivo
	7	não contaminada	Negativo	7	não contaminada	Negativo

Fonte: Dados Primários.

Na segunda rodada e terceira rodada, as amostras contaminadas e não contaminadas foram analisadas fora de ordem. Este procedimento é mais adequado para evitar a obtenção de resultados esperados. A repetitividade e reprodutividade do método para os dois analistas na segunda e terceira rodada também foi de 100% de concordância.

3.2 Estudo da estabilidade

Durante o tempo de validação do método foi realizado em paralelo um estudo da estabilidade do extrato filtrado. Onde os extratos filtrados dos padrões (sacarose, maltose, maltodextrina e lactose) em leite e do branco, foram guardados em diversos frascos e armazenados em freezer. A cada quinze dias eram retirados do freezer um frasco de cada padrão e um branco, estes eram deixados em temperatura ambiente para que descongelassem e após eram aplicados na placa cromatográfica para a realização da corrida e das outras etapas da análise na figura 5.

Este estudo foi realizado durante três meses e se mostrou eficiente, pois durante todo este tempo os extratos se mostraram estáveis, nos dando assim, uma alternativa de que caso não seja possível realizar todas as etapas da análise no mesmo dia, seja possível então realizar a primeira etapa guardando o extrato filtrado em freezer para que o restante das etapas sejam realizadas posteriormente.

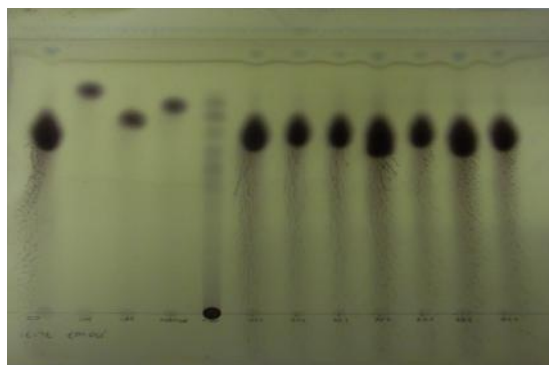


Figura 5. Corrida cromatográfica do estudo da estabilidade

4. CONCLUSÕES

A determinação de maltodextrina em leite por Cromatografia em Camada Delgada é um método simples e de baixo custo, tornando-se viável. Sendo este um método qualitativo, para a validação foram necessários avaliar a repetitividade e reprodutibilidade do método. Estes se mostraram muito satisfatórios tendo em vista que se obteve 100% de concordância entre os resultados obtidos, em relação a repetitividade e reprodutibilidade do método.

Juntamente com a validação, foi realizado um estudo da estabilidade do extrato obtido na filtração. O presente estudo apresentou ótimos resultados durante o período de três meses, fornecendo-nos assim uma alternativa para dias em que alguma eventualidade venha a ocorrer.

5. REFERÊNCIAS

1. <http://www.fea.unicamp.br/deptos/dta/carnes/files/ABCZrevista41.pdf>, acessada em Janeiro 2013.
2. <http://www.unicruz.edu.br/seminario/artigos/saude/ADULTERA%C3%87%C3%83O%20EM%20LEITE%20FLU%C3%8DDO%20%E2%80%93%20REVIS%C3%83O%20BIBLIOGR%C3%81FICA.pdf>, acessada em Janeiro 2013.
3. http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/1023_GED.pdf, acessada em Janeiro 2013.
4. <http://www.simleite.com/home/palestras/simleite6.pdf>, acessada em Janeiro 2013.
5. Chronakis, I.S.; *On the Molecular Characteristics, Compositional Properties, and Structural-Functional Mechanisms of Maltodextrins: A Review*, Critical Reviews in Food Science, 38:7, 599-637,1998.
6. Coutinho, A. P. C. *Tese de Doutorado*, Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil, 2007.
7. Albano, F.M.; Rodrigues, M.T.; *Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais*, Rede Metrológica: Porto Alegre, 2009.