

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LETICIA FRAGA MATOS CAMPOS DE AQUINO

ESTUDO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE ATRAVÉS DAS
METODOLOGIAS DE ÁCIDO SIÁLICO LIVRE, ELETROFORESE SDS-PAGE E
ANÁLISE SENSORIAL

NITERÓI
2013

LETICIA FRAGA MATOS CAMPOS DE AQUINO

**ESTUDO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE ATRAVÉS DAS
METODOLOGIAS DO ÁCIDO SIÁLICO LIVRE, ELETROFORESE SDS-PAGE E
ANÁLISE SENSORIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora:
Professora Doutora ADRIANA CRISTINA DE OLIVEIRA SILVA

Coorientador:
Professor Doutor CARLOS ADAM CONTE JUNIOR

Niterói, RJ
2013

LETICIA FRAGA MATOS CAMPOS DE AQUINO

**ESTUDO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE ATRAVÉS
DAS METODOLOGIAS DO ÁCIDO SIÁLICO LIVRE, ELETROFORESE SDS-
PAGE E ANÁLISE SENSORIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 06 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Adriana Cristina de Oliveira Silva - UFF
Orientadora

Professor Doutor Carlos Adam Conte Junior - UFF
Coorientador

Professor Doutor Adriano Gomes da Cruz – IFRJ

Professor Doutor Thiago da Silveira Álvares - UFRJ

Niterói
2013

À minha família, Evandro, Denise e
João Bernardo e ao meu namorado, Francys,
que sempre estiveram ao meu lado
para que eu tivesse forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Por me guiar, iluminar e proteger sempre e em todo lugar.

Aos meus pais, Evandro e Denise, que são a base da minha vida. Sem vocês eu não teria conseguido. Obrigada por serem, acima de tudo, meus melhores e eternos amigos e por me ensinarem a lutar. Agradeço ao meu irmão, JB, que me prova todo dia que carinho não tem limites. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu amigo, namorado e companheiro, Francys Vasconcellos, por tudo que me ensinou sobre amor, carinho e dedicação. Pela paciência em escutar minhas lamentações e por sempre saber o que dizer e quando dizer. Suas palavras me ensinam muito. Obrigada principalmente por me ensinar que eu sou capaz. Amo você!

Ao meu avô José Aloísio, a pessoa mais maravilhosa que eu pude conhecer até hoje, por simplesmente existir. Me orgulho muito de você e de ter seguido a sua profissão.

À minha avó Ana Amélia pelas orações dedicadas a toda a família. Tenho certeza que a senhora nunca se esquece de ninguém. Isso nos dá muita força.

Aos meus avós maternos, que aonde quer que estejam, tenho a certeza que estão olhando por mim.

À minha família postiça, Julciara e Chaboudet. Obrigada pelo carinho, paciência, e muito amor.

Aos meus companheiros do mestrado, Marilu, Júlia, Daniel, Marion e Carol que descobriram comigo que essa vida não é fácil.

Ao meu amigo Vinícius, que foi essencial para o correto andamento das minhas análises microbiológicas. Obrigada por tornar meus dias mais divertidos e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos meus companheiros no eterno desafio chamado eletroforese, Bruno e Anninha, pela disponibilidade e muito conhecimento técnico.

Às minhas amigas, que mesmo longe, me deram forças para continuar Bebel, Fabi, Gabi e Jú. Minha vida seria muito sem graça sem vocês.

Ao meu amigo Glaucinho, que mesmo de tão longe, continua sendo o meu anjinho.

Ao meu professor e acima de tudo grande amigo, Carlos Conte, que sempre esteve ao meu lado nos momentos de dúvidas e angústias, e muito me ajudou com seus conhecimentos técnicos e ideias inovadoras.

À minha orientadora, Adriana Cristina, pelo desafio proporcionado pelo meu projeto.

Ao professor Adriano Cruz pela ajuda e pelos novos desafios oferecidos.

Ao coordenador Sérgio Mano, pelas cobranças, pelos conselhos e pelo carinho.

Ao amigo Dráusio, por se mostrar sempre disposto a resolver todos os nossos problemas.

Aos professores Mônica Queiroz, Robson Maia e Teófilo Pimentel, por permitirem o uso de seus laboratórios e equipamentos para execução de parte do meu experimento e por se mostrarem sempre solícitos.

À CAPES, pela bolsa concedida para realização deste projeto de mestrado.

*“Se ao deitar você sabe que hoje sua parte já fez,
pode ficar tranquilo, que o seu já está guardado.
Os anjos estão do nosso lado...”*

Gabriel Wionoscky Garcia

RESUMO

A análise quantitativa do ácido siálico livre (ASL) ou ligado ao glicomacropéptido (GMP) utilizada na identificação da fraude pela adição de soro de queijo ao leite cru, além de ser sensível e de fácil realização, não exige equipamentos sofisticados e pessoal qualificado. No presente estudo este método foi comparado com a eletroforese SDS-Page, que apresenta grande sensibilidade na detecção deste tipo de fraude, pela facilidade na identificação de bandas proteicas com mesmo peso molecular da α 1 e β caseínas e β lactoglobulinas que perdem intensidade nas amostras fraudadas com soro de queijo. No entanto, a matéria prima estudada sofre constante influência de fatores externos que podem levar ao aumento natural dos teores de GMP. Nas diferentes circunstâncias amostrais (leite fraudado com 0; 0,5; 1; 2,5; 5, 10, 15 e 20% de soro), ambos os métodos se mostraram sensíveis identificando a fraude a partir de 0,5%. Na análise do ASL se utilizou a desproteínização do leite com ácido tricloroacético na concentração de 24%. Na eletroforese SDS-Page a desproteínização foi feita pelo ponto isoelétrico do GMP (2,8). No Brasil, o tempo de resfriamento do leite até o processamento é de 72 horas. Por este motivo, o aumento da concentração de ácido siálico durante o tempo de estocagem (84 horas) foi acompanhado a cada 12 horas juntamente com o aumento de psicotróficos a fim de verificar a correlação entre eles. O coeficiente de correlação determinado entre os resultados obtidos pelos dois métodos não foi significativo ($r=0,5864$), mostrando a não correspondência entre eles. A análise descritiva quantitativa foi utilizada com o intuito de se estabelecer atributos específicos às amostras fraudadas com soro de queijo que permitam a sua identificação sem o auxílio de análises instrumentais. A aparência translúcida, aroma adocicado e sabor salgado foram os principais atributos que contribuíram para a diferenciação das amostras. Os resultados deste trabalho sugerem que os métodos sensoriais, em especial, a análise descritiva quantitativa, podem contribuir de forma significativa para a detecção de fraudes com soro de queijo em leite, oferecendo uma resposta rápida para a identificação deste problema.

Palavras-chave: Glicoproteína. Fiscalização. Sensibilidade. Adição de soro. Ácido siálico.

ABSTRACT

The quantitative analysis of free sialic acid (FSA) or connected to glycomacropeptide (GMP) used in the identification of fraud by adding cheese whey raw milk, besides being sensitive and easy to perform, does not require sophisticated equipment and qualified personnel. In the present study this method was compared with the electrophoresis SDS-Page, which is highly sensitive in detecting this type of fraud, the ease in identifying protein bands with the same molecular weight of α_1 and β caseins and β lactoglobulins that lose intensity in samples added with cheese whey. However, the raw material studied suffers constant influence of external factors that can lead to increased levels of natural GMP. In different circumstances sample (milk added with 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20% cheese whey), both methods were sensitive identifying fraud from 0.5%. In the analysis of FSA was used to deproteinization of milk with trichloroacetic acid at a concentration of 24%. In electrophoresis SDS-Page deproteinization was made by isoelectric point the GMP (2.8). In Brazil, the cooling time of milk to processing is 72 hours. For this reason, the concentration of sialic acid during the storage time (84 hours) was accompanied every 12 hours along with the increase of psychotrophics to verify the correlation between them. The correlation coefficient between the results determined by the two methods was not significant ($r = 0.5864$), demonstrating no correspondence between them. The quantitative descriptive analysis was used in order to establish specific attributes of samples added with cheese whey allowing its identification without the aid of instrumental analysis. The translucent appearance, sweetness odour and saltiness flavour were the key attributes that have contributed to the differentiation of the samples. These results suggest that sensory methods, in particular the quantitative descriptive analysis, can contribute significantly to the detection of fraud in milk whey, providing a quick response to the identification of this problem.

Keywords: Glycoprotein. Surveillance. Sensitivity. Addition of whey. Sialic acid.

SUMÁRIO

RESUMO, f. 7

ABSTRACT, f. 8

SUMÁRIO, f. 9

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, f. 10

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, f. 11

1 INTRODUÇÃO, f. 12

2 REVISÃO DE LITERATURA, f. 14

2.1 FRAUDE EM LEITE FLUIDO, f. 16

2.2 SORO DE QUEIJO, f. 18

2.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS, f. 20

2.3.1 IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO SIÁLICO LIVRE E LIGADO À GLICOPROTEÍNA DO LEITE, f. 21

2.3.2 ELETROFORESE SDS-PAGE, f. 22

2.3.3 ANÁLISE SENSORIAL, f. 23

3 DESENVOLVIMENTO, f. 25

3.1 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO ÁCIDO SIÁLICO E ELETROFORESE SDS-PAGE NA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE CRU, f. 25

3.2 ANÁLISE SENSORIAL COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE FLUIDO, f. 45

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, f.62

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 63

6 APÊNDICES, f. 69

6.1 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO: APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO ÁCIDO SIÁLICO E ELETROFORESE SDS-PAGE NA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE CRU, f. 69

6.2 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO: ANÁLISE SENSORIAL COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE FLUIDO, f. 70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Quantidade de leite cru ou resfriado adquirido e industrializado pelo estabelecimento, segundo os meses – Brasil

Quadro 2: Produção, consumo e exportação do leite no Brasil nos últimos 4 anos e a perspectiva de crescimento até 2020.

Figura 1: Consumo de leite por habitante em equivalentes litros por ano no Brasil.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADQ – Análise Descritiva Quantitativa

AGE – Assessoria de Gestão Estratégica

ASL – Ácido Siálico Livre e ligado à glicoproteína do soro

CMP – Caseinomacropéptido

COAGRO – Cooperativa Agropecuária Capanema

DBO₅ – Demanda Biológica de Oxigênio

Da – Dalton

DPE – Defensoria Pública do Estado

ES – Espírito Santo

EST – Extrato Seco Total

FAPRI – “Food and Agricultural Policy Research Institute”

FEAM – Fundação Estadual do Meio Ambiente

GMP – Glicomacropéptido

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography”

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NANA – N-acetilneuramínico

OCB – Organização das Cooperativas Brasileiras

ONU – Organização das Nações Unidas

Page – Polycramide gel electrophoresis

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SELEI – Serviço de inspeção de leite e derivados da Divisão de Operações Industriais/Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

UAT – Ultra Alta Temperatura

1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento completo e, de sua composição, são gerados diferentes tipos de derivados. A maioria destes derivados são advindos da fração proteica, que apesar de ser considerada baixa frente a outros alimentos de origem animal, é capaz de originar alimentos altamente proteicos como os queijos.

A prática de fraudes na área de laticínios é um problema recorrente. Dentre as principais fraudes destaca-se a adição de soro de queijo ao leite, com a finalidade de aumentar o volume fornecido com custo reduzido. Este tipo de fraude ganha notoriedade em função da carência de alternativas tecnológicas de descarte do soro e da sua difícil detecção quando adicionado ao leite, uma vez que o soro de queijo, subproduto do processamento de baixo ou nenhum valor comercial, possui composição físico-química semelhante à do leite fluido.

As técnicas empregadas e previstas para análises físico-químicas de leite fluido, apesar de fácil execução, muitas vezes exigem uma demanda de tempo e gasto de reagentes analíticos. O aumento no número e frequência de análises após o lançamento do Programa Nacional da Qualidade do Leite concretizou a necessidade de desenvolvimento de procedimentos analíticos automatizados, de menor custo e de rápida realização.

A análise do ácido siálico livre e ligado à glicoproteína do leite (ASL) apesar de ser um método de fácil realização, vem sendo estudado por alguns autores para avaliar a adição de soro ao leite. No entanto, este parâmetro pode sofrer influência de fatores externos que, em grande parte, não podem ser controlados e, como consequência, levam ao aumento da concentração de ácido siálico no leite.

A eletroforese SDS-Page pode ser considerada um método eficaz para detecção deste tipo de fraude pela sensibilidade na identificação de proteínas que caracterizem a adição de soro ao leite, como a α s e β caseínas e a β lactoglobulina.

A ADQ é frequentemente utilizada para definir os melhores atributos que caracterizam um determinado alimento. Entretanto, neste estudo, esta metodologia foi utilizada na identificação da fraude com soro de queijo em leite.

Levando em consideração as questões anteriores, os objetivos do presente estudo foram comparar a eficiência e sensibilidade das técnicas do ASL e da eletroforese SDS-Page, além de estabelecer atributos sensoriais capazes de descrever e identificar amostras de leite fraudadas com soro de queijo.

Este estudo possui grande relevância pela necessidade de aperfeiçoamento ou mesmo substituição de uma ou mais metodologias oficiais utilizadas na identificação da fraude de leite com soro de queijo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

O leite é composto basicamente de água, gordura, proteínas e carboidratos, além de pequenas quantidades de substâncias minerais, substâncias hidrossolúveis transferidas diretamente do plasma sanguíneo, proteínas específicas do sangue e traços de enzimas. Além de alimento completo, constitui matéria prima de extrema versatilidade tecnológica, advinda de sua própria composição, cujos constituintes, isoladamente ou em conjunto, proporcionam a obtenção de imensa gama de derivados (FUKUDA, 2003).

Nos últimos 50 anos, a preocupação com a qualidade e segurança dos alimentos, processos de produção e a relação entre os dois tem ganhado ênfase (BURNS, 2001). Esta preocupação levou ao surgimento de técnicas que mantivessem a qualidade inicial da matéria prima por mais tempo, como a granelização, pasteurização e utilização da Ultra Alta Temperatura (UAT), assim como, técnicas que pudessem identificar adulterações na matéria prima (MACHADO et al, 2002). O quadro 1 mostra a relação entre a quantidade de leite cru adquirido e industrializado pelo estabelecimento. Nele podemos verificar que apenas uma pequena quantidade de leite não passa pelo processo de industrialização.

Quadro 1: Quantidade de leite cru ou resfriado adquirido e industrializado pelo estabelecimento, segundo os meses – Brasil

Meses	Leite cru ou resfriado adquirido (mil litros)	Leite cru ou resfriado industrializado pelo estabelecimento (mil litros)
Total do ano	10 965 655	10 932 189
Total do 1º trimestre	5 763 141	5 745 693
Janeiro	2 019 988	2 013 790
Fevereiro	1 849 360	1 845 016
Março	1 893 793	1 886 888
Total do 2º trimestre	5 202 513	5 186 496
Abril	1 705 356	1 702 140
Mai	1 745 175	1 740 428
Junho	1 751 982	1 743 928

Fonte: IBGE/DPE/COAGRO - Pesquisa Trimestral do Leite

Esta melhoria na qualidade dos alimentos fornecidos aos consumidores, fez com que o consumo e, conseqüentemente, a produção aumentassem gradativamente (AGE/MAPA, 2010).

O constante crescimento na produção, consumo e exportação de leite no Brasil podem ser observados no quadro 2. Este aumento deve estar associado a garantias na qualidade do produto visando manter este panorama crescente e, desta forma, expandir e consolidar novos mercados.

Quadro 2: Produção, consumo e exportação do leite no Brasil nos últimos 4 anos e a perspectiva de crescimento até 2020.

Ano	Produção*	Consumo*	Exportação*
2009/10	31,12	27,33	1,10
2010/11	31,80	27,93	1,18
2011/12	32,46	28,52	1,27
2012/13	33,12	29,11	1,35
2013/14	33,78	29,71	1,44
2014/15	34,45	30,30	1,52
2015/16	35,11	30,90	1,60
2016/17	35,77	31,49	1,69
2017/18	36,43	32,08	1,77
2018/19	37,09	32,68	1,85
2019/20	37,75	33,27	1,94
Taxa anual	1,95%	1,98%	5,78%

*Bilhões de litros de leite

Fonte: AGE/MAPA, 2010

A produção deverá crescer a uma taxa anual de 1,95%, o que corresponde a uma produção de 37,8 bilhões de litros de leite cru no final do período das projeções. O consumo deverá crescer a uma taxa de 1,98% ao ano nos próximos anos (AGE/MAPA, 2010). Essa taxa é bem superior à observada para o crescimento da população brasileira (1,17%) (IBGE, 2011). Outros institutos de pesquisa apresentam taxas de crescimento nacionais para o leite fluido ainda mais promissoras, como a taxa de 2,96% ao ano projetada pelo FAPRI (“Food and Agricultural Policy Research Institute”).

Apesar de o Brasil ocupar atualmente a 65ª posição no consumo mundial de produtos lácteos, de acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o consumo de produtos lácteos aumentou nos últimos 10 anos passando de 120 para 170 litros de leite por habitantes ao ano. Apesar do aumento no consumo de leite na última década, este ainda está abaixo do recomendado pela ONU, que recomenda

de 200 a 220 litros de leite por ano. No país, o Estado de São Paulo é o primeiro no consumo de laticínios, enquanto o Rio de Janeiro se encontra em segundo lugar (GUIMARÃES, 2012). Estes dados demonstram a importância da preocupação com a qualidade de leite e derivados na região sudeste, onde se encontram também a maioria dos consumidores destes produtos. Na figura 1 podemos visualizar o crescimento do consumo per capita de leite nos últimos 16 anos.

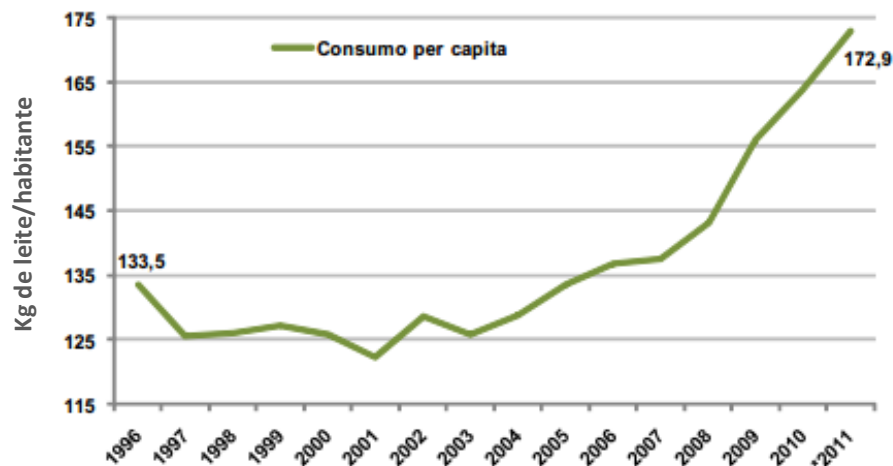


Figura 1: Consumo de leite por habitante em equivalentes litros por ano no Brasil (Hemme et al., 2010).

Devido a grande relevância do leite e seus derivados na economia brasileira, o estudo de tecnologias que garantam a qualidade do leite fornecido ao consumidor e que identifiquem possíveis adulterações vem ganhando cada vez mais notoriedade (HEMME et al., 2010)

2.1 FRAUDE EM LEITE FLUIDO

A prática de fraudes na área de laticínios é um problema recorrente no Brasil. Diversos trabalhos foram publicados relatando a existência de fraudes em leite fluido em diferentes regiões (BORGES; PINTO, 2008; BORGES et al., 2009; CRUZ; SANTOS, 2008; DAHMER, 2006; MARTINS, 2006; MARTINS, 2010; SILVA, 2008; SILVA et al., 2010), indicando que uma quantidade importante do leite produzido em todo país possui algum tipo de adulteração. No entanto, existe uma carência de trabalhos evidenciando a prática de fraudes ao leite em outros países, surgindo assim uma lacuna de informações sobre a utilização destas práticas apenas no Brasil.

As fraudes de natureza econômica mais comumente encontradas são a adição de água, sacarose, peróxido de hidrogênio, neutralizantes para mascarar a acidez, leite e soro de queijo (RECIO et al., 2000; KARTHEEK et al., 2011).

Dentre as principais fraudes destaca-se a adição de soro de queijo ao leite, com a finalidade de aumentar o volume fornecido com custo reduzido. Este tipo de fraude ganha notoriedade em função da difícil detecção, uma vez que o soro de queijo, subproduto do processamento de baixo valor comercial (ZADOW, 1997), possui composição físico-química semelhante à do leite fluido. Apesar de a legislação proibir a sua adição ao leite cru, pasteurizado, em pó ou submetido à UAT, essa é uma prática comum e atrativa que torna a concorrência mercadológica desleal, prejudicando a empresa idônea e o consumidor (CARVALHO et al., 2007). Frequentemente, visando mascarar este tipo de fraude, são adicionadas em conjunto substâncias reconstituintes com o objetivo de recompor a aparência e algumas características físico-químicas do leite fraudado com água ou soro de queijo, tais como o cloreto de sódio e a sacarose (GONZÁLEZ, 2008).

A adição de soro de queijo ao leite leva a diminuição dos componentes sólidos e do valor nutritivo do leite (TRONCO, 1997). Entretanto, por ser um derivado lácteo, dependendo da quantidade adicionada e das manobras utilizadas para mascarar este tipo de fraude, os procedimentos analíticos oficiais não tem sensibilidade para identificar a sua adição, levando, muitas vezes a avaliação equivocada da qualidade do leite que será destinado ao consumo (FUENTE; JUARÉZ, 2005).

O então chefe do SELEI (MAPA) em 2003 admitiu que apesar de todo empenho das unidades fiscalizadoras com a utilização de metodologias analíticas modernas, as adulterações do leite ainda ocorrem porque, quem fraudava, se especializa em burlar a fiscalização através de formulações que dificilmente serão detectadas pelas análises físico-químicas oficiais.

Em 2007, foi deflagrada pela polícia federal a operação "Ouro Branco" após denúncias de um funcionário de uma Cooperativa de Leite que informou às autoridades sobre a adição de diversos produtos ao leite, inclusive substâncias tóxicas ao organismo humano, pela unidade beneficiadora em que trabalhava (OCB/ES, 2007). Neste caso específico, o funcionário teve que detalhar como ocorria a fraude, pois, a cooperativa utilizava formulações especiais que mascaravam sua detecção pelas metodologias oficiais.

Na cidade de Niterói, em trabalho realizado por Silva e colaboradores (2010), após análise de 15 marcas de leite pasteurizado e de 30 marcas de leite UAT foi verificado que quase a totalidade do leite pasteurizado (93,3%) e 20% do leite UAT comercializado apresentava algum tipo de irregularidade, como adição de substâncias neutralizantes, água e inibidores do crescimento bacteriano, com o intuito de aumentar o volume e mascarar a má qualidade do leite. Contudo, em muitas amostras, apesar da detecção da fraude, não foi possível determinar a substância adicionada por limitações das técnicas oficiais.

2.2 SORO DE QUEIJO

O soro de queijo pode ser definido como o líquido remanescente obtido após precipitação e remoção da caseína do leite durante a fabricação de queijos, o qual representa, em média, 85-90% do volume total de leite e retém 55% dos seus nutrientes. Este resíduo é composto por uma gama de proteínas solúveis, nitrogênio não proteico, sais minerais, vitaminas e, principalmente, a lactose (KOSIKOWSKI, 1979).

O tipo de soro de queijo produzido industrialmente e a sua composição, dependem do tipo de queijo fabricado e da tecnologia de processamento empregada na produção, o que leva a uma variação no teor de proteínas, gordura e minerais (FURTADO; POMBO, 1979). De acordo com o queijo que é produzido, podem ser gerados três tipos de soro láctico: doce, ácido e o obtido da coagulação de proteínas a quente na produção de ricota (FONSECA, 2008).

A composição físico-química do soro foi determinada por diferentes pesquisadores (BARBOSA, et al., 2010; FITZSIMONS et al., 2006; KOSKOWSKI, 1979; SILVEIRA; ABREU, 2003; TEIXEIRA; FONSECA, 2008), encontrando os seguintes valores médios entre os trabalhos: $-0,560^{\circ}\text{H}$ para crioscopia; 6,28 para pH; $11,92^{\circ}\text{D}$ para acidez; 6,63% para sólidos totais (EST); 93,49% para umidade; 0,53% para gordura; 0,82% para proteína; 4,79% para lactose; 0,47% para cinzas; 0,19% para cloretos; 1,025 para densidade e quantidades traço de vitaminas. Outros componentes são os minerais como cálcio, sódio, magnésio, potássio e fósforo.

Segundo Aimutis (2004), Stephan (2006) e Szerman et al (2007), o soro de leite bovino apresenta 0,8% de proteínas, de baixo peso molecular (máximo de 18kDa), que correspondem de 20 a 25% do total de proteínas encontradas no leite,

sendo as predominantes a beta-lactoglobulina (50-57%), a alfa-lactoalbumina (25%), a soro albumina bovina (10%), imunoglobulinas, lactoferrinas e glicomacropéptidos (8%).

O leite por sua vez, tem os seguintes padrões físico-químicos segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2002): máximo de $-0,530^{\circ}\text{H}$ de índice crioscópico; mínimo de 11,4% de EST; mínimo de 3% de gordura; mínimo de 2,9% proteína; mínimo de 4,3% de lactose; 6,7 de pH; 15°D para acidez; 87,5% de água; e 1,028-1,034 de densidade.

Apesar do valor nutricional, o elevado volume aliado à carência de produtos com ampla aceitação elaborados a base de soro de queijo e a falta de tecnologias que permitam o aproveitamento do mesmo, esta matéria prima é comumente lançada nos rios e córregos sem o tratamento adequado (PONSANO et al, 1992). Apenas uma pequena parte do soro é empregada na fabricação de ricota e na produção de bebidas lácteas (ALMEIDA et al, 2001), sendo mais comum a utilização do soro na alimentação de suínos ou seu lançamento em rios.

Considerando a competitividade no mercado e a necessidade de baixar o custo de produção, são poucas as empresas que demonstram preocupação ambiental com relação ao destino correto de seus efluentes. Na maioria dos laticínios, que são de pequeno e médio porte, isto ocorre em decorrência das dificuldades financeiras para manter pessoal especializado para trabalhar com inovações tecnológicas e operar sistemas de efluentes (FARIA et al., 2004). Esse fato é preocupante, pois o destino incorreto do soro de leite pode gerar a poluição das águas, odor desagradável, bem como o comprometimento da estrutura físico-química do solo e, conseqüentemente, descumprimento da lei (CHAVES et al., 2010).

De acordo com FEAM (2003), o soro é um dos poluentes líquidos que mais contribuem para a alta carga poluidora das indústrias de laticínios. A demanda bioquímica de oxigênio (DBO_5) do soro varia de 25.000 a 120.000 mg.L^{-1} , o qual contém metade dos sólidos do leite integral. As indústrias produtoras de derivados de leite têm enfrentado grandes problemas com os resíduos gerados em sua produção (LAGRANGE; DALLAS, 1997; CETESB, 2008). Estima-se que para cada quilo de queijo produzido, a indústria de laticínios gere nove quilos de subproduto com elevada concentração de matéria orgânica (FARIA et al., 2004; BIEGER; RINALDI, 2009).

Essa alta produção associada à dificuldade de identificação da adição do soro ao leite por metodologias analíticas, leva a prática de fraudes em um grande número de indústrias. Por isso, atualmente a comunidade científica impulsionada pelos órgãos governamentais vem estudando o desenvolvimento de novos procedimentos analíticos aplicados a detecção deste tipo de fraude.

2.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As metodologias que vem sendo utilizadas na detecção de fraudes em leite fluido necessitam de aperfeiçoamento e os limites de detecção devem ser aprimorados (FUENTE; JUARÉZ, 2005). A maior dificuldade encontrada pela Inspeção Federal ligada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é atualizar as técnicas de detecção de fraudes tão rapidamente quanto o surgimento de diferentes tipos de adulterações.

As análises físico-químicas oficiais utilizadas para leite fluido, apesar de estarem estabelecidas, não são específicas para determinação de soro, apresentando apenas ligeiras modificações dos parâmetros encontrados após a realização deste tipo de fraude. A partir dos valores obtidos, pode-se apenas sugerir a ocorrência da fraude com soro, pois esses valores são muito semelhantes aos encontrados quando há a aguagem no leite (CRUZ; SANTOS, 2008).

Ainda não existe um consenso entre os autores sobre o método mais adequado para este tipo de fraude. Algumas metodologias têm sido utilizadas para detectar a fraude com soro de queijo, assim como a determinação da relação entre a proteína do soro e a proteína total através da espectroscopia de absorção (MIRALLES et al, 2000), a técnica da ninhidrina ácida (ácido siálico), a HPLC (YAO et al, 1989, modificado por FUKUDA et al, 2004; PRATA et al, 2012) e a eletroforese SDS-Page (AMAYA, 2006). As metodologias realizadas neste estudo foram a identificação do ácido siálico livre (ASL) e ligado à glicoproteína do leite (BRASIL, 2006) e a eletroforese SDS-Page, relacionadas, respectivamente, com a presença do ácido siálico e das bandas proteicas presentes nas amostras de leite. Além disso, foi utilizada ainda uma ferramenta da análise sensorial não utilizada anteriormente para a identificação de fraudes, a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), com o intuito de se levantar atributos específicos que permitam a identificação da fraude com soro de queijo em leite, diminuindo o custo e tempo de execução das análises.

2.3.1 IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO SIÁLICO LIVRE E LIGADO À GLICOPROTEÍNA DO LEITE

A técnica do ASL baseia-se na identificação do ácido siálico no soro, liberado durante a elaboração de queijos por ação enzimática. O ácido siálico (N-acetilneuramínico), também denominado NANA, é um componente natural do leite, particularmente ligado ao GMP que é liberado da κ -caseína (BRASIL, 2006).

A κ -caseína encontra-se na forma de uma mistura de polímeros unidos por ligações dissulfídicas intermoleculares, com peso molecular de 19 kDa e 169 resíduos de aminoácidos (CHEFTEL et al., 1989). É uma fosfoproteína contendo aproximadamente 6-10% de carboidratos, consistindo de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico ou NANA), galactose e N-acetilgalactosamina (FOX; McSWEENEY, 1998).

A κ -caseína é a fração das caseínas insensível ao cálcio e, em condições normais, desempenha um importante papel na estabilidade da micela, impedindo a precipitação da α s e β -caseína, em presença deste íon (SHAMMET et al., 1992). Essa propriedade estabilizadora é perdida durante a coagulação enzimática pela quimosina.

Na clivagem inicial por ação da quimosina há, portanto, a formação de dois peptídeos, sendo um deles composto pelos resíduos de aminoácidos 1 a 105, designado de para- κ -caseína e o outro do resíduo 106 a 169, que, por carrear todos os açúcares da κ -caseína, é conhecido como glicomacropéptido (GMP). Um desses açúcares é o ácido N-acetilneuramínico (NANA) ou ácido siálico. A κ -caseína é heterogênea, apresentando duas variantes genéticas A e B, podendo o teor de carboidratos na molécula variar de 0 a 15% e, como há a possibilidade de se obter fragmentos com ausência glucídica, o peptídeo terminal pode ser chamado de macropéptido ou caseinomacropéptido (CMP) (GUINEE; WILKINSON, 1992).

A técnica do ASL para a determinação quantitativa de ácido siálico foi homologada como metodologia oficial no Brasil, através da Instrução Normativa n.68 de 14/12/06 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006) que regulamentou os Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos.

De acordo com Fukuda e colaboradores (2004), o método do ASL além de ser de fácil execução, tem se mostrado eficiente na rotina laboratorial, não exigindo

equipamentos sofisticados ou pessoal qualificado. Quando comparada com outras análises, apesar de possuir menor custo, a sua utilização apresenta algumas limitações como a alta sensibilidade ao oxigênio e o extenso tempo de duração das análises. Além disso, alguns autores (LEITNER et al.; 2006) citam que o aumento no número de psicrotróficos interfere diretamente na análise do ASL, pois leva ao aumento das concentrações do ácido siálico e, conseqüentemente, a um resultado falso positivo. Este método pode ainda sofrer interferência de fatores relacionados com a matéria prima como a refrigeração do leite pela obrigatoriedade da granelização e a conversão do plasminogênio em protease no leite proveniente de animais com mastite e vacas no final da lactação (BRASIL, 2006).

Além disso, este método só apresenta uma boa sensibilidade quando se tem a comparação com a amostra controle, ou seja, um leite comprovadamente não fraudado, pois há uma constante variação na concentração de ácido siálico ao longo da estocagem que não permite que sejam fixados valores específicos para identificação ou não da fraude com soro como foi feito por Fukuda (1996) e Prata (2002).

2.3.2 ELETROFORESE SDS-PAGE

A eletroforese é utilizada para separar misturas complexas de proteínas, a partir de células, matrizes alimentares, frações subcelulares, ou imunoprecipitados, para investigar composições de subunidade ou para purificar as proteínas para utilização em outras aplicações (SCHRÖDER et al., 2008). Esta metodologia é amplamente utilizada em pesquisas com a finalidade de identificar fraudes em alimentos e a possível presença de proteínas estranhas à composição normal de produtos cárneos e lácteos. A eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-Page, do inglês *sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel electrophoresis*) é o método mais simples e barato para analisar proteínas (STEPHAN, 2006; XIONG et al., 2006; ANEMA, 2009).

As proteínas migram em resposta a um campo elétrico através dos poros de uma matriz de gel de poliácridamida. O tamanho dos poros diminui com o aumento da concentração de acrilamida. A combinação do tamanho do poro, da carga e da massa molecular aparente da proteína determinam a taxa de migração da mesma pelo gel (GALLAGHER, 2007). Segundo Laemmli (1970), é importante que nesta

fase todas as proteínas estejam totalmente desnaturadas, papel desempenhado pelo dodecil sulfato de sódio (SDS) adicionado às amostras proteicas a serem analisadas no gel.

Diversas modificações são fornecidas para aplicações específicas. Para a separação de peptídeos e proteínas pequenas, como é o caso do GMP, a separação pelo ponto isoelétrico (isoeletrofocalização) das proteínas também pode ser utilizada (CRISCIONE et al., 2009).

A eletroforese em SDS-Page tem sido amplamente utilizada para separar proteínas nativas e desnaturadas (KAISER, 1985). Em alguns países, esta técnica tem sido utilizada para detectar a adulteração do leite com soro de queijo, prática fraudulenta comumente realizada (MONTÁNEZ et al, 2000). Diversos estudos a nível mundial (PINTO, 1991; ROSAS, 1997) tem evidenciado a presença de GMP em amostras de leite, que constitui um indicador deste tipo de fraude. Esta prática se tornou comum, pois, por ser um componente natural do leite, suas propriedades coligativas são similares, o que torna sua presença quase imperceptível quando adicionado ao leite (AMAYA, 2006).

Uma das vantagens da utilização da eletroforese SDS-PAGE está relacionada com ausência da variação no perfil proteico ao longo da estocagem que ocorre em outras metodologias, como é o caso do ASL, que sofre constante influência da quantidade de GMP. Esta característica seria a principal razão para se inserir a eletroforese SDS-Page como análise oficial na identificação da fraude com soro de queijo. Além disso, a acrilamida é uma substância orgânica simples que forma gelatinas em largo espectro de concentração, permite o processamento simultâneo de diversas amostras e dispensa a presença do analista em algumas de suas etapas. No entanto, estes analistas devem ser treinados e o custo desta análise é considerado alto frente à técnica do ASL.

2.3.3 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é definida como uma disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais da forma como são percebidas pelo sentido da visão, olfato, sabor e audição (AMERINE et al, 1965 apud DUTCOSKY, 2007).

Várias questões são respondidas pela análise sensorial, seja a percepção do consumidor e suas respostas emocionais (Young et al., 2004), a influência do tipo de armazenamento (Park et al., 2006), substituição de ingredientes, embalagem e processamento (Childs et al., 2007) sobre o alimento. Existem diversos tipos de testes sensoriais que podem ser ajustados para atender a um objetivo específico

O método utilizado neste estudo foi a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) desenvolvida por Stone e Sidel (1993), que permite descrever as principais características que compõem a aparência, aroma, textura e sabor de um alimento, além de medir a intensidade das sensações percebidas.

Diferentemente do uso habitual da ADQ, no presente trabalho, esta ferramenta foi utilizada com o intuito de se estabelecer atributos específicos que caracterizassem e identificassem amostras de leite fraudadas com soro de queijo. Não existem relatos na literatura sobre a utilização desta metodologia na identificação de fraudes, no entanto, seu uso diminuiria o custo e o tempo de análise gasto na identificação destas amostras.

3 DESENVOLVIMENTO

Seguem os dados experimentais obtidos no presente estudo que foram discutidos e utilizados para o desenvolvimento dos periódicos submetidos a publicação.

3.1 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO ÁCIDO SIÁLICO E ELETROFORESE SDS-PAGE NA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE CRU

Applying the sialic-acid and SDS-Page techniques to identify adulteration of milk with cheese whey

AQUINO

This study compared the sensitivity and limitations of the methodologies customarily used to identify adulteration with cheese whey in milk with a different methodology, SDS-Page electrophoresis. The data obtained are expected to provide support for regulatory bodies, by suggesting new tools that could be more sensitive than the present official methods to identify this type of adulteration.

Applying the sialic-acid and SDS-Page techniques to identify adulteration of milk with cheese whey

LFMC Aquino^{*}; ACO Silva^{*}; BRCC Lima[†]; ACVCS Canto[†]; CH Wanderley¹; VO Alves[‡]; AG Cruz; CA Conte Júnior[†].

^{}Laboratory of Inspection and Technology of Milk and Dairy Products; [†]Laboratory of Physical-Chemical Control of Animal Products; [‡]Laboratory of Microbiology; Faculty of Veterinary Medicine; Universidade Federal Fluminense; C. P.: 64; 24230-340; Niterói - RJ - Brazil.*

Author for correspondence: Leticia Fraga Matos Campos de Aquino. Rua General Silvestre Rocha, 33/102, Icaraí, Niterói – RJ, 24220-170. (55)(21)3617-4500; (55)(21)9904-4499. leticiaaquino@veterinaria.med.br

ABSTRACT

This study determined and compared the sensitivity of different analytical procedures for analysis of milk after experimental adulteration with different concentrations of cheese whey. Fluid milk samples were adulterated experimentally with different whey concentrations (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20%) and analyzed by official analytical methods (MA) (acidity, alizarol, freezing point, density, nonfat dry milk, fat, lactose, protein, and minerals) by the method of identification of free sialic acid (ASL) associated with milk glycoprotein, and SDS-Page electrophoresis. Titratable acidity and nonfat dry milk were sensitive to a 0.5% whey content, lactose and pH to 1% whey and above, fat and protein from 2.5%, alizarol from 5%, ash from 10% and freezing point from 15%. Density and minerals showed no sensitivity in identifying this type of adulteration. In the ASL test, a significant difference was observed between the concentration of the sialic-acid control sample and all adulterated samples, with sensitivity to a whey content of 5% and above. A direct correlation between the storage time and the concentration of ASL was apparent only in samples with 0.5, 1 and 2.5% whey ($r = 0.7788, 0.7825, 0.7099$). The correlation between the concentration of the adulterant and the concentration of ASL at different storage times was not significant from 60 hours on. SDS-Page electrophoresis also showed sensitivity to adulteration with 0.5% whey.

Keywords: Glycoprotein. Surveillance. Sensitivity.

INTRODUCTION

The practice of adulteration of dairy products gained importance in Brazil when in 2007, Operation "White Gold" began, in which we investigated the addition of materials to fluid milk (OCB / ES, 2007). The addition of whey milk aims to increase the volume of milk supplied at less cost; whey is among the leading adulterants because it is a byproduct of little or no commercial value. This type of adulteration is becoming a widespread because whey has a physico-chemical composition similar to that of fluid milk, which makes it difficult to detect (Zadow, 1997).

The increase in the number and frequency of analyses by the dairy sector shows the level of concern and need for automated, rapid, lower-cost analytical procedures to identify and monitor this type of adulteration. Because the perpetrators have become more practiced in evading inspection, the need arises for more-sensitive techniques to detect fluid milk whey (de la Fuente and Juárez, 2005).

The European Union is concerned by adulteration caused by the addition of whey to milk powder. In 2001, the European Commission adopted two methods, gel filtration chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC), to detect glycomacropeptide (GMP) (Commission Regulation EC no. 213/2001). In Brazil, official methods to detect added whey in milk were published in 1991 and, so far, these two methods are still recommended by national legislation (Decree no. 124, 23 September 1991, MAPA). The method of identifying and quantifying GMP by high-performance liquid chromatography, similar to that recommended by the European Union, has not changed; however, the sialic-acid identification method was simplified, improved, and published in 1994 (Fukuda, 1994).

Sialic acid (N-acetylneuraminic) is a natural component of milk, one of the carbohydrates that comprise κ -casein. During enzymatic coagulation of milk, sialic acid is released from κ -casein together with GMP to the cheese whey (Fox and McSweeney, 1998).

Reported evidence raises some doubts regarding the application and efficacy of this technique, as it is influenced by variables that are often observed in this matrix such as, for example, natural growth of psychrotrophic bacteria in cooled raw milk and the quantity of somatic cells present in milk (Pombo-Wolfchoon and Pinto, 1985).

In the present study, electrophoresis was used for observation of specific protein bands for α 1 and β -casein, β -lactoglobulin and GMP, to allow identification of adulteration in milk whey. Although this method is relatively expensive and requires a trained staff to perform, it is a sensitive and efficient technique for detecting this type of adulteration (Galindo-Amaya et al., 2006).

There is still no consensus as to the most appropriate method for detecting adulteration with whey. Miralles et al. (2000) compared the three methods, capillary electrophoresis (CE), capillary electrophoresis-SDS (SDS-CE), and determining the relationship between the whey protein and the total protein by the fourth derivative spectrum of the absorption (UV-4th Der.). They concluded that although all three methods proved effective, the UV-4th Der. is the most suitable for routine use, since it is low-cost compared with CE and CE-SDS and requires no trained staff. However, a study by Souza et al. (2000) showed that SDS-Page electrophoresis followed by densitometric analysis is a suitable method for identification and quantification of cheese whey and additional complex mixtures of milk. Galindo-Amaya et al. (2006), using SDS-PAGE electrophoresis alone, reported that detection of GMP by this technique is a specific and sensitive parameter for detecting small amounts of added whey (from 1%). Galindo-Amaya et al. (2008) used the tool studied by Miralles et al. (2000) to detect this adulteration, determining the relationship between the whey protein and the total protein by UV-4th Der, and found that this offers several advantages: it is a rapid, non-destructive, efficient technique that adapts to any mixture of proteins and can be applied to dairy products containing hydrolyzed proteins.

In 2009, Oancea used immunochromatography to identify GMP and found the method easy to perform and interpret, accurate, and precise, and suggested its use as a routine method to identify adulteration with cheese whey. Prata (2012) defined the parameters of interpretation for the spectrophotometric and chromatographic methods (HPLC) for the quantification of their GMP and CMP free milk through the interrelationships determined for different sample components, combined with controlled studies of cheese-whey adulteration of milk.

In addition to the lack of published information to evaluate and study the presence of this type of adulteration, there is a need for researchers and government oversight by methods that are low-cost, easy and effective in identifying it. The objective of this study was to compare the official analytical methods (acidity, alizarol, freezing point, density, nonfat dry milk, fat, lactose, protein and minerals) to sialic acid (ASL) and SDS-Page electrophoresis, in order to determine the lower limits of detection of cheese-whey adulteration of raw milk.

MATERIAL AND METHODS

A sample of raw milk to be experimentally adulterated and used in the manufacture of Minas fresh cheese to obtain whey was obtained on a private farm in the city of Areal. Milking was done with a monitoring team present, to ensure that no substance was added to the milk.

The Minas fresh cheese was produced according to the method described by Magalhães (1981), modified. To 2 L of raw milk (32-35 °C), 2 mL of rennet (HA-LA®) was added. This milk was homogenized and allowed to stand for 30 min. The resulting curd was cut into cubes of approximately 1 cm and was slowly stirred for 2-3 min. The curd was allowed to rest for 3 min and then stirred again until the whey became clear. The whey was separated by filtration using nylon mesh and immediately used for the experiment.

Aliquots of 1.5 L of milk were experimentally adulterated with cheese-whey concentrations of 0 (control), 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20%, yielding eight experimental groups. For each experimental group 12 different analyses were conducted: titratable acidity, ash, freezing point, fat (AOAC, 2005), alizarol, density, nonfat dry milk, ASL (Brazil, 2006) and psychrotrophic aerobic bacteria count (APHA, 2001), lactose, protein, minerals (Boeco-Lac 50®) and SDS-Page electrophoresis.

Milk samples with added whey and kept under refrigeration in controlled temperature ($3\pm 1^{\circ}\text{C}$) were used to determine whether the growth of psychrotrophic bacteria and different storage times (0-84 hours) could affect the increasing concentrations of ASL.

The SDS-Page electrophoresis was performed basically in four stages: extraction and quantification of proteins, preparation and running of polyacrylamide gels (Page) in the presence of sodium dodecylsulfate (SDS), and photographic documentation of the gels.

The protein was extracted according to the method described by Criscione and colleagues (2008), with some modifications. Samples were defatted by centrifugation (3,500 rpm/ 30 min) and subsequent cooling ($-20^{\circ}\text{C}/15$ min), allowing easy removal of the fat layer formed. The protein fractions were separated by isoelectric precipitation. The casein was separated (pH 4.6) using 4 N HCl. The sample was then centrifuged and the supernatant (whey protein) increased by further acidification (pH 2.8) using 4 N HCl. Following recentrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in buffer urea and thiourea (8 M urea and 2 M thiourea).

Protein was quantified according to Zor and Selinger (1996). The samples were diluted with Coomassie Blue G-250® in three proportions (1:1, 1:10 and 1:100) and read at wavelengths of 595 and 450 nm. Then, the ratio ($\lambda_{595}/\lambda_{450}$) was calculated. This method reduces the possibility of error by reading the dye that did not bind to proteins. After choosing

the best dilution, the samples were diluted with running buffer (4% SDS, 0.5 M Tris-HCl at pH 6.8, 50 mM DTT, 20% glycerol and a pinch of bromophenol blue) and frozen at -20°C.

The resolution gel (15%) was prepared with 2.8125 ml of 40% Acrylamide/Bis, 0.067 ml of SDS 10%, 3.35 µl of Temed (Bio-Rad®), 1.67 ml of Tris-HCl 1.5 M at pH 8.8 (Sigma Aldrich®), 2.9 ml H₂O, and 33.42 µl of 10% ammonium persulfate (Synth®). A solution of 10% ammonium persulfate was prepared separately in an Eppendorf tube and added at the end of the preparation, preventing premature polymerization of the gel. The stacking gel was prepared using 4% of the same solutions (Sapan et al. 1999).

The running gel (20 mA and 200 V) was made after full polymerization and application of 20 µl of each sample and 5 µl of standard molecular weight (Fermentas®) in the wells. Then the gels were stained with Coomassie Blue solution G-250 for 24 h and destained with a solution of 10% glacial acetic acid, 10% methanol and 80% distilled water until the protein bands were revealed. They were photodocumented with a Sony® DSC-W530 digital camera and evaluated with the aid of software TotalLab Quant®. The sensitivity of this technique was assessed by electrophoretic gel analysis, and the increased protein concentration in the protein band of interest identified by the software.

The data obtained by the official analysis technique and ASL were studied using GraphPad Prism® software (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). The sensitivity of the ASL technique was determined using two-way ANOVA at the different concentrations employed. To assess the existence of a correlation (r) between sialic acid quantification and growth of psychrotrophic bacteria, we used the Pearson correlation.

RESULTS

The mean values obtained are shown in Table 1. In the official methods, there was a significant difference ($p < 0.001$) between the amount of acidity of the control sample (15.147 ± 0.001) and of the samples adulterated with 0.5, 5, 15 and 20% (14.256 ± 0.001) of cheese whey and sweet whey (8.910 ± 0.001). The ash content showed a significant difference ($p < 0.001$) between the control sample (0.710 ± 0.001) and the sample adulterated with 1% cheese whey (0.660 ± 0.0141). However, this difference was only gradual, beginning with 10% (0.565 ± 0.0353) added cheese whey. The values of freezing point showed a significant difference ($p < 0.05$) beginning with 15% (-0.550 ± 0.0020) added cheese whey.

The nonfat dry milk differed significantly ($p < 0.001$) beginning with adulteration with 0.5% (11.35 ± 0.001) cheese whey. Lactose showed a significant difference ($p < 0.001$) beginning with 1% (4.415 ± 0.0212) adulteration. The pH values showed significant differences ($p < 0.05$) in adulteration with 1 (6.67 ± 0.001), 2.5 (6.71 ± 0.0120) and 20% (6.67 ± 0.001) cheese whey and sweet whey (6.59 ± 0.001). Fat and protein contents differed significantly ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively) beginning with the levels of 2.5% (3.00 ± 0.001 and 3.36 ± 0.0141 , respectively) added cheese whey. The mineral content differed significantly only between the control sample (0.670 ± 0.001) and sweet whey (0.580 ± 0.001). The densities did not differ significantly ($p > 0.05$).

The correlations between the values obtained in the different official analyses with different whey concentrations are shown in Table 2. There was a significant inverse correlation for ash ($r = -0.8232$), cryoscopy ($r = -0.9026$), nonfat dry milk ($r = -0.9474$), fat ($r = -0.9930$), lactose ($r = -0.9628$), protein ($r = -0.9582$) and minerals ($r = -0.9526$). However, no significant correlations were observed with acidity ($r = -0.4815$), density ($r = -0.5802$) and pH ($r = -0.3593$) with increasing concentrations of whey.

In the alizarol test, lumps formed in milk adulterated with 5% cheese whey.

In the ASL test, there was a significant difference ($p < 0.001$) between the sialic acid concentration in the control sample and all adulterated samples. With regard to storage times, there was a significant difference between the concentrations found at time zero and the other storage times (12 to 84 h). Direct correlations between storage time and the concentration of sialic acid in the samples were apparent only with 0.5, 1 and 2.5% cheese whey ($r = 0.7788, 0.7825, 0.7099$); correlations for the other concentrations of whey were not significant. In the different storage periods, from 60 h on there was no significant correlation between the concentrations of whey and sialic acid. The concentrations of sialic acid and the psychrotrophic bacteria count were not correlated for any storage period.

The results of the electrophoretic profiles of the protein fraction of the samples are shown in Figure 2. The most important protein bands for the identification of the adulterant were analyzed on the same gel as the control sample (lane 3), the cheese whey (lane 2), the standard molecular weight (Fermentas ®; lane 5) and the samples with 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20% whey (lines 4, 6, 7, 8, 9, 10 and 1, respectively).

DISCUSSION

The results showed that of the parameters analyzed, acidity, density and pH were not useful for identifying adulteration of cheese whey with milk, since they showed no correlation between the increase in whey concentration and the values for each parameter. However, analyses of ash, freezing point and mineral concentration were significantly correlated with increased whey concentrations. Tronco (1997) reported that the freezing temperature is the most constant characteristic of milk, and therefore the cryoscopic index is considered proof of accuracy in determining milk quality. Nonetheless, these analyses showed low sensitivity to these parameters (10, 15 and > 20% respectively) in this type of adulteration.

Fat content was the parameter most influenced by the cheese whey adulterant ($r = -0.9930$). This can be explained by the difference between the values found in milk fat (3.10%) and sweet whey (0.80%); therefore, as cheese coagulates, the fat globules are retained along with the proteins, with little loss to cheese whey. A similar reduction was also observed by Cortez et al. (2008), who studied different types of adulterants in milk. A lower fat content in cheese whey (0.68%) compared to whole milk was also found by Teixeira and Fonseca (2008).

For the protein quantification, the values obtained by the Kjeldahl method and ultrasonic apparatus (BOECO LAC-50 ®) were compared between the control sample and the sweet whey. The values obtained demonstrated that ultrasound can be an effective method for this type of analysis. In ultrasonic spectroscopy, the concentration of colloids is determined from the evaluation of mechanical disturbances caused by the sound waves passing through the sample, and is recommended for analysis of proteins in dairy products (Miles et al., 1990; Buckin et al., 2003). Protein concentration showed a gradual decrease with increased addition of whey. These results can be explained by the smaller amount of whey proteins (0.6%), compared to whole milk (2.5%).

Regarding lactose, a slight decrease after the adulteration was expected, since the amount present in cheese whey (3.755%) is very close to that found in whole milk (4.450%). Other investigators (Teixeira and Fonseca, 2008; Cortez et al., 2008) found similar results. However, it should be noted that, because lactose varies least in terms of percentage among milk components, any difference, no matter how small, may be indicative of adulteration or mastitis.

The test using the determination of nonfat dry milk also showed high sensitivity in detecting this type of adulteration (0.5%), with a significant correlation ($r = -0.9474$). The nonfat dry milk consists mainly of fat, lactose, protein and minerals. Whey, despite having the

same components, has lower concentrations (8.06%) when compared to the levels of nonfat dry milk found in whole milk (11.47%). Therefore, as the concentration of the adulterant was increased, the levels of nonfat dry milk decreased. Teixeira and Fonseca (2008) also found levels below those of whole milk in cheese whey (6.28%), explaining the reduction observed in this study. However, it is worth noting that these small variations found in this parameter can be easily corrected with other types of adulterants, such as the addition of solutes to correct nonfat dry milk and the density after water is added to the milk.

Another parameter of milk quality used by industry is the alizarol test, which is considered the first screening test for raw milk. Observation of the formation of lumps, which occurs at levels of 5% added whey and above, causes the milk to be analyzed for the recovery or conditional (Brazil, 1983). The pH indicator present in the substance showed that the formation of lumps was not caused by high acidity, but rather because of the salt imbalance that occurs from alcohol destabilization of the casein micelles (Brazil, 2006). However, factors such as the occurrence of unstable non-acidic milk, a complex phenomenon with multiple causes, altering the physical and chemical characteristics of milk, can lead to the instability of the casein micelle, although within the normal range of acidity (Fischer, 2006).

The results observed in this study show that, using routine analytical procedures, even with a significant difference in the percentage of the components present in milk and milk with added whey, these results do not indicate this type of adulteration. Also, in whey concentrations below 15%, the physico-chemical parameters remained within the predicted values for normal milk (AOAC, 2005).

According to Fukuda (1994), the ASL method can be applied as a routine method; it is more accurate, sensitive, and easy to perform, and does not require sophisticated equipment or skilled personnel. However, in the present study, we observed a high variation in the quadruplicate quantifications, using the methodology proposed by these authors. Thus, our

findings indicate that the proposed ASL method did not show the high degree of precision required for identifying this type of adulteration using concentrations.

Regarding the sensitivity of the ASL, the data observed in this study are consistent with those found by Fukuda (1994). We found significant differences beginning with the sample adulterated with 0.5% whey, indicating that this is a very sensitive method for detecting this type of adulteration. This sensitivity was determined from the concentration values of ASL obtained from adulterated samples compared to those observed in the whole milk.

Based on their results, Fukuda et al. (1996) proposed the use of the acid ninhydrin test as a screening method to classify milk received by processors with respect to possible adulteration with cheese whey, classifying it as negative (absorbance at 470 nm \leq 0.300 or \leq 5.14 mg free Nana/ml of milk), suspect (absorbance at 470 nm between 0.300 and 0.600 or between 5.14 to 10.64 mg free Nana/ml of milk) or positive (absorbance at 470 nm $>$ 0.600 or $>$ 10.64 mg Nana free/ml of milk). Prata (2002), expanding the sampling universe, found that the acidic ninhydrin method is effective in determining adulteration with whey, and modified the values suggested by Fukuda et al. (1996) in the various categories: negative (A470 nm. 0.300 or 5.14 mg Nana/liter of milk), suspect (0.300 $<$ A470 nm. 0.450 or 5.15 to 7.89 mg/l) and positive (A470 nm. 0.451 or $>$ 7.89 mg Nana/liter of milk). Prata (2012), in a study performed to increase the sample universe, found similar values for the different categories. However, the results of this study, shown in Figure 1, indicate that there is great variation in absorbance between different storage times. In whole milk, the absorbance reached 0.460 with 72 hours of cooling, which is the maximum time allowed for milk to be stored in cooling tanks; this exceeded the limit ($<$ 0.300) found by Fukuda (1996) and Prata (2002, 2012) for negative samples. Suspect samples (0.301 to 0.450) included those adulterated with 0.5% whey (12, 24, 48 and 60 hours of cooling) and the sample adulterated with 5% whey at time

0. Samples that were considered positive (> 450) ranged from 0.5% added whey (at 36 hours of cooling) to 10% whey (at time 0).

Some authors (Leitner et al., 2006) have reported that an increased number of psychrotrophic bacteria directly interferes with the ASL analysis, because it leads to increased concentrations of sialic acid and consequently a false-positive result. However, in view of the lack of correlation between the increase in psychrotrophic bacteria and sialic acid concentration, it is suggested that there is interference between the direct parameters. The results obtained in this study suggest that increases of sialic acid during storage are not due to an increase in the number of psychrotrophic bacteria. Furthermore, the data demonstrate a need to expand the sampling universe in order to establish specific limits for different cooling times for milk, in order to avoid testing errors (false positives) of the samples.

Examining Figure 2, one can see mainly the protein bands that have low molecular weight (between 10 and 75 kDa). In the protein profile, some protein bands with apparent molecular mass similar to α 1 and β caseins (24 kDa), β lactoglobulin (20 kDa) and GMP (15 kDa), showed a relationship between their intensities and increased concentrations of the adulterant. The apparent molecular weight was obtained with the aid of TotalLab Quant software (Table 3). In the control sample, the bands corresponding to α 1 and β casein and β lactoglobulin showed greater color intensity, greater volume (325,721.2) than the other samples with different concentrations of cheese whey, where the corresponding bands were lighter. The decrease in volume of these bands was confirmed with the aid of the same software. Statistically significant ($p < 0.001$) differences were obtained between the control sample, the adulterated samples, and sweet whey. The values found for these bands are presented in Table 4. There was no correlation between the concentration of adulterant and intensity of the protein bands of α 1 and β casein, β lactoglobulin and GMP ($r = -0.3081$, -0.3538 , -0.4271 , respectively). Because the reduction in volume of these bands is not

proportional to the percentage of adulterant, it occurs abruptly in all adulterated samples. Although whey contains some β lactoglobulin (0.4%), this is a very small quantity, and is identified as a shadow in the protein profile of whey, with a volume of 84,369. However, GMP shows subtle differences in color intensity, i.e., does not undergo clearly visible changes that would allow the identification of adulteration. This method was effective because, although the amount of GMP varies during storage or because of external factors, other proteins that can be used to indicate adulteration remain. Furthermore, because the difference in color intensity is clear by visual inspection of the gel, it is not necessary to quantify the proteins in the gel, which would considerably increase the cost and time of analysis.

CONCLUSIONS

The results of this study indicated that the official analytical methods are not effective in identifying adulteration of milk with cheese whey, because the differences found are not specific to this type of adulteration. Both ASL and SDS-Page electrophoresis were sensitive in identifying adulterated samples compared to the control sample. However, because of the constant variation found in ASL values during the storage period, it is not possible to establish fixed concentration limits to enable standardization in identifying adulteration. SDS-Page electrophoresis was more effective because it does not depend only on the GMP concentration, but is able to identify α 1 and β caseins and β lactoglobulin in polyacrylamide gel.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for financial support from the State of Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho Research Foundation (FAPERJ), process numbers E-26/112.393/2012 and E-

26/103.003/2012. L.F.M.C. Aquino was supported by the Coordination for Higher-Level Training (CAPES).

REFERENCES

- Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *J. Nutr.*, 134:989S-995S. doi: 0022-3166/04.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. 18th ed. Gaithersburg, MD.
- APHA. 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th ed. Washington, DC.
- BRASIL. Instrução Normativa No. 51 de 18 set. 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. *Diário Oficial da União, Brasília*, no. 183, 20 set. 2002, seção 1, p. 13-22.
- Buckin, V., B. O'Driscoll, and C. Smyth. 2003. Ultrasonic spectroscopy for material analysis: recent advances. *Spectrosc. Eur.* 15:20-25.
- European Commission (EC). 2001. Regulation. *Journal Commun. Europea* No. 213L:1-99.
- Cortez, M. A. S., V. G. Dias, R. G. Maia, and C. C. A. Costa. 2010. Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes* 65(376):18-25.
- Criscione, A., V. Cunsolo, S. Bordonaro, A.M. Guastella, R. Saletti, A. Zuccaro, G. D'Urso, and D. Marletta. 2009. Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *Int. Dairy J.* 19:190-197. doi:10.1016/j.idairyj.2008.10.015
- de la Fuente, M.A. and M. Juárez. 2005. Authenticity Assessment of Dairy Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:563-585. doi: 10.1080/10408690490478127

- Fischer, V., L.T. Marques, M. B. Zanela, V. Fruscalso, M. E. R. Ribeiro, W. J. Stumpf, I. D. B. Silveira, and R. S. Barbosa. 2006. Chemical composition of unstable non-acid milk. In: International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. Rev. Ciênc. Vet., Pirassununga 4:52-53.
- Fox, P. F., and P. L. H. McSweeney. 1998. Milk proteins. Pages 146-264 In: Dairy Chemistry and Biochemistry. 1st ed. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Fukuda, S. P. 1994. Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. Dissertação. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil.
- Fukuda, S. P., S. M. Roig, and L. F. Prata. 1996. Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para a detecção da adição de soro ao leite. Ciênc. Tecn. Alim. 16:52–56.
- Galindo-Amaya, L. M., E. Valbuena-Colmenares, and E. Rojas-Villaruel. 2006. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por Page-SDS como índice de adulteración de leche. Rev. Cient., FCV-LUZ 16:308-314.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, N. B. Kristensen, K. C. Hanson, and J. W. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. Anim. Feed Sci. Technol. doi:10.1016/j. anifeedsci.2006.01.012
- Lane, M. A., R. L. Baldwin, and B. W. Jesse. 1995. Sheep rumen metabolic development in response to different dietary treatments. J. Dairy Sci. 78(Suppl. 1):310. (Abstr.)
- Miles, C. A., D. Shore, and K. R. Langley. 1990. Attenuation of ultrasound in milks and creams. Ultrasound 28:394-400.
- Miralles B., B. Bartolomé, L. Amigo, and M. Ramos. 2000. Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. J. Dairy Sci. 83:2759-2765.

- Oancea, S. 2009. Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. *Rom. Biotech. Lett.* 14:4146-4151.
- Prata, L. F. 2002. Distribuição de Glicomacropeptídeo livre, em leites crus e pasteurizados, na definição da detecção de fraudes por adição de soro. Tese de Livre-docência apresentada à FCAVJ / Unesp. Jaboticabal, SP, Brazil. 105p.
- Prata, L. F., and C. B. Prata. 2012. Determinação de GMP e CMP no leite por métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – parâmetros metodológicos. *Arch. Vet. Sci.* 17:29-39.
- Sapan, C. V., R. L. Lundblad, and N. C. Price. 1999. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:99-108.
- Souza, E. M. T., S. F. Arruda, P. O. Brandão, and E. M. A. Siqueira. 2000. Electrophoretic analysis to detect and quantify additional whey in milk and dairy beverages. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 20:314-317.
- Teixeira, L. V., and L. M. Fonseca. 2008. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em varias regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 60:243-250.
- Tronco, V. M. 1997. Controle Físico-Químico do Leite. Pages 103-105 In: Tronco, V. M. *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite.* UFSM, Santa Maria, RS, Brazil.
- Tyrrell, H. F., and P. W. Moe. 1975. Effect of intake on digestive efficiency. *J. Dairy Sci.* 58:1151–1163.
- Wolfschoon-Pombo, A. F., and A. P. E. F. Pinto. 1985. A qualitative method for the detection of rennet whey in milk. *Ciênc. Tecn. Alim.* 5:111–115.
- Zadow, J. G. 1997. *Modern Dairy Technology: Advances in Milk Processing.* Vol. 2. Elsevier, London, UK.

Zor, T., and Z. Zelinger. 1996. Linearization of the Bradford Protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 236:302-308.

Table 1. Mean contents of titratable acidity, ash, freezing point, density, total solids (EST), fat, lactose, pH, protein and mineral salts in raw whole milk adulterated with different percentages of whey (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20%).

Adulteration (%)	Titratable acidity (°D)	Ash (%)	Freezing point (°H)	Density	Nonfat Dry Milk (%)	Fat (%)	Lactose (%)	pH	Protein (%)	Mineral salts (%)
0%	15.147 ±0.0001 ^A	0.710 ±0.0001 ^C	-0.540 ±0.0020 ^E	1.030 ±0.0001 ^G	11.47 ±0.0001 ^I	3.10 ±0.0001 ^K	4.450 ±0.0141 ^M	6.68 ±0.0001 ^O	3.390 ±0.0141 ^Q	0.670 ±0.0001 ^S
	(15.147-15.147)	(0.71-0.71)	-(0.538-0.542)	(1.030-1.030)	(11.47-11.47)	(3.10-3.10)	(4.44-4.46)	(6.68-6.68)	(3.38-3.40)	(0.67-0.67)
0.5%	14.256 ±0.0001 ^B	0.720 ±0.0001 ^C	-0.541 ±0.0010 ^E	1.030 ±0.0001 ^G	11.35 ±0.0001 ^J	3.10 ±0.0001 ^K	4.430 ±0.0141 ^M	6.68 ±0.0120 ^O	3.380 ±0.0141 ^Q	0.670 ±0.0001 ^S
	(14.256-14.256)	(0.72-0.72)	-(0.540-0.541)	(1.030-1.030)	(11.35-11.35)	(3.10-3.10)	(4.42-4.44)	(6.67-6.69)	(3.37-3.39)	(0.67-0.67)
1%	15.147 ±0.0001 ^A	0.660 ±0.0141 ^D	-0.541 ±0.0001 ^E	1.029 ±0.0001 ^G	11.22 ±0.0001 ^J	3.10 ±0.0001 ^K	4.415 ±0.0212 ^N	6.67 ±0.0001 ^P	3.370 ±0.0141 ^Q	0.665 ±0.0070 ^S
	(15.147-15.147)	(0.65-0.67)	-(0.540-0.541)	(1.029-1.029)	(11.22-11.22)	(3.10-3.10)	(4.40-4.43)	(6.67-6.67)	(3.36-3.38)	(0.66-0.67)
2.5%	15.147 ±0.0001 ^A	0.710 ±0.0001 ^C	-0.541 ±0.0020 ^E	1.030 ±0.0001 ^G	11.22 ±0.0001 ^J	3.00 ±0.0001 ^L	4.405 ±0.0212 ^N	6.71 ±0.0120 ^P	3.360 ±0.0141 ^R	0.665 ±0.0070 ^S
	(15.147-15.147)	(0.71-0.71)	-(0.538-0.543)	(1.030-1.030)	(11.22-11.22)	(3.00-3.00)	(4.39-4.42)	(6.70-6.72)	(3.35-3.37)	(0.66-0.67)
5%	14.256 ±0.0001 ^B	0.685 ±0.0212 ^C	-0.543 ±0.0010 ^E	1.030 ±0.0001 ^G	11.35 ±0.0001 ^J	3.00 ±0.0001 ^L	4.390 ±0.0141 ^N	6.68 ±0.0060 ^O	3.350 ±0.0141 ^R	0.660 ±0.0001 ^S
	(14.256-14.256)	(0.67-0.70)	-(0.542-0.544)	(1.030-1.030)	(11.35-11.35)	(3.00-3.00)	(4.38-4.40)	(6.68-6.69)	(3.34-3.36)	(0.66-0.66)
10%	15.147 ±0.0001 ^A	0.565 ±0.0353 ^D	-0.542 ±0.0020 ^E	1.030 ±0.0001 ^G	11.12 ±0.0001 ^J	2.80 ±0.0001 ^L	4.355 ±0.0070 ^N	6.68 ±0.0001 ^O	3.320 ±0.0001 ^R	0.660 ±0.0001 ^S
	(15.147-15.147)	(0.54-0.59)	-(0.541-0.544)	(1.030-1.030)	(11.12-11.12)	(2.80-2.80)	(4.35-4.36)	(6.68-6.68)	(3.32-3.32)	(0.66-0.66)
15%	14.256 ±0.0001 ^B	0.635 ±0.0212 ^D	-0.550 ±0.0020 ^F	1.029 ±0.0001 ^G	10.74 ±0.0001 ^J	2.70 ±0.0001 ^L	4.310 ±0.0141 ^N	6.68 ±0.0001 ^O	3.285 ±0.0070 ^R	0.650 ±0.0001 ^S
	(14.256-14.256)	(0.62-0.65)	-(0.548-0.553)	(1.029-1.029)	(10.74-10.74)	(2.70-2.70)	(4.30-4.32)	(6.68-6.68)	(3.28-3.29)	(0.65-0.65)
20%	14.256 ±0.0001 ^B	0.570 ±0.0141 ^D	-0.552 ±0.0010 ^F	1.029 ±0.0001 ^G	10.50 ±0.0001 ^J	2.50 ±0.0001 ^L	4.315 ±0.0070 ^N	6.67 ±0.0001 ^P	3.295 ±0.0070 ^R	0.650 ±0.0001 ^S
	(14.256-14.256)	(0.56-0.58)	-(0.551-0.553)	(1.029-1.029)	(10.50-10.50)	(2.50-2.50)	(4.31-4.32)	(6.67-6.67)	(3.29-3.30)	(0.65-0.65)
Soro	8.910 ±0.0001 ^B	0.585 ±0.0070 ^D	-0.587 ±0.0001 ^F	1.027 ±0.0001 ^G	8.06 ±0.0001 ^J	0.80 ±0.0001 ^L	3.755 ±0.0212 ^N	6.59 ±0.0001 ^P	0.840 ±0.0282 ^R	0.580 ±0.0001 ^T
	(8.910-8.910)	(0.58-0.59)	-(0.587-0.587)	(1.027-1.027)	(8.06-8.06)	(0.80-0.80)	(3.74-3.77)	(6.59-6.59)	(0.82-0.86)	(0.58-0.58)

Means of six determinations, with standard deviation and minimum and maximum values (in parentheses).

Values in the same column with different capital letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2. Indices of correlation * (r) of titratable acidity, ash, freezing point, density, nonfat dry milk, fat, lactose, pH, protein and mineral salts.

Correlation	Titratable acidity	Ash	Freezing point	Density	Nonfat dry milk	Fat	Lactose	pH	Protein	Minerals
r	-0.4815	-0.8232	-0.9026	-0.5802	-0.9474	-0.993	-0.9628	-0.3593	-0.9582	-0.9526

* Among the higher concentrations and increased sialic acid

Table 3. Identification of apparent molecular weights of the more important protein bands found in gel electrophoresis (values obtained with the aid of the software TotalLab Quant)

Band	Molecular Weight								
	Milk	0.5%	1%	2.5%	5%	10%	15%	20%	Whey
α s1 and β caseins	23.559	24.257	24.257	24.669	24.745	24.751	24.743	25.633	23.836
β lactoglobulins	19.914	21.146	20.789	21.162	20.939	20.925	21.411	21.868	20.593
GMP	15.644	15.547	15.580	15.612	15.750	15.732	15.815	15.943	15.660

Line 5 is not included because it is the molecular weight standard.

Table 4. Volume of the more important protein bands found in gel electrophoresis (values obtained with the aid of the software TotalLab Quant)

Band	Volume								
	Milk	0.5%	1%	2.5%	5%	10%	15%	20%	Whey
α s1 and β caseins	259354.80	24267.80	40128.20	41287.40	77949.80	63928.00	33364.00	44981.20	19176.20
β lactoglobulins	325721.20	112909.80	124424.80	103132.60	142874.80	126816.40	130264.00	84207.20	84369.00
GMP	306912.40	281018.80	288802.00	251046.80	201344.80	212382.80	346859.00	240407.20	201496.40

Line 5 is not included because it is the standard molecular weight.

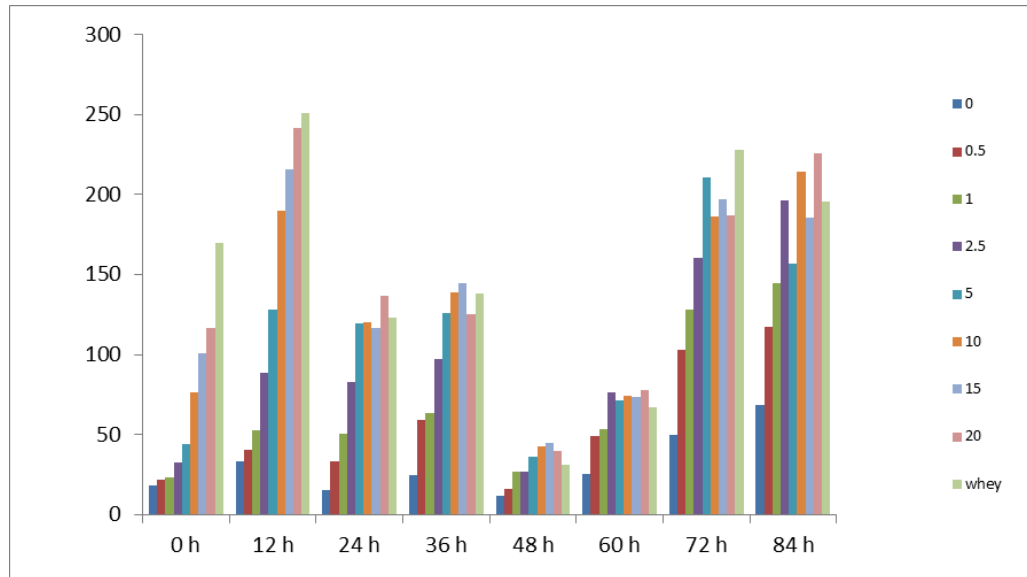


Figure 1. Concentrations of free and glycomacropeptide-bound sialic acid after different storage periods, in whole milk and milk adulterated with different percentages of whey (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20%)

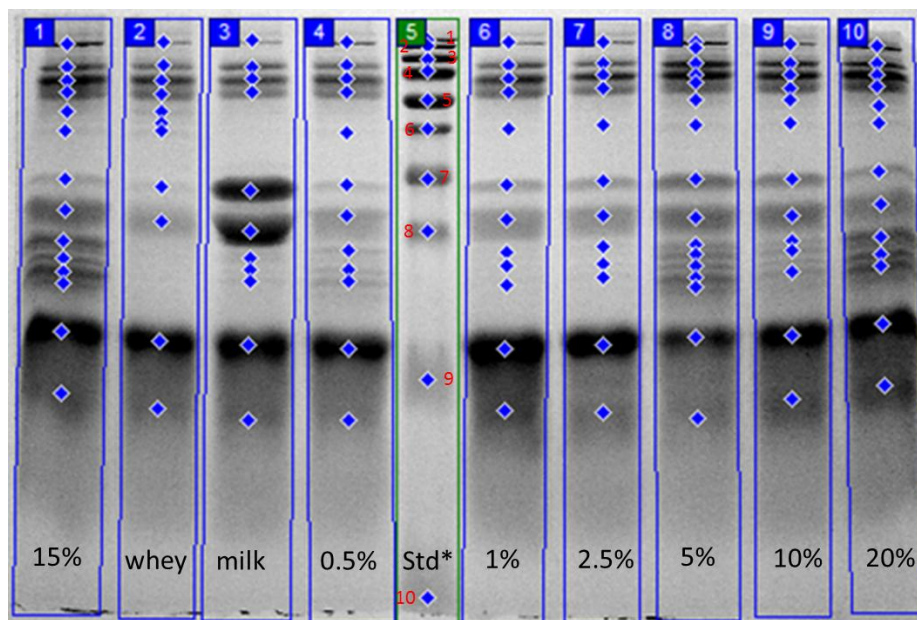


Figure 2. Electrophoresis profiles of protein fractions of samples of whole milk, cheese whey, and whole milk adulterated with 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 and 20% whey.

*Standard (Std) molecular weight: 1-250; 2-150; 3-100; 4-75; 5-50; 6-37; 7-25; 8-20; 9-15; 10-10.

3.2 ANÁLISE SENSORIAL COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE FLUIDO

Detection addition of cheese whey in milk: a sensory analysis can be useful?

AQUINO

The aim of this work was to verify whether a trained panel (n=13) was able to identify fraud with cheese whey in milk in different percentages (0, 5, 10, 15 and 20%). Descriptive sensory profiles of five samples (0, 5, 10, 15 and 20%), were determined using a trained panel (n=13). The panel was initially selected in a triangular test (n=13) and subsequently trained using Quantitative Descriptive Analysis (QDA). The information obtained in this work may be important to validate the application of the QDA in dairy industries to identify this type of fraud.

Detection addition of cheese whey in milk: a sensory analysis can be useful?

LFMC Aquino^{*}; ACO Silva^{*}; AG Cruz[†]; CA Conte Júnior[‡].

^{}Laboratory of Inspection and Technology of Milk and Dairy products; [‡]Laboratory of Physical-Chemical Control of Animal Products; Faculty of Veterinary Medicine; Universidad Federal Fluminense; C. P.: 64; 24230-340; Niterói - RJ - Brazil. [†]Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ), Professional Master in Food Science and Technology (PGCTA), Street Senator Furtado, 171, Maracanã, 20270-021, Rio de Janeiro, Brazil.*

Author for correspondence: Leticia Fraga Matos Campos de Aquino. Rua General Silvestre Rocha, 33/102, Icaraí, Niterói – RJ, 24220-170. (55)(21)3617-4500; (55)(21)9904-4499. leticiaaquino@veterinaria.med.br

ABSTRACT

Adding cheese whey in milk is a commonly formed fraudulent practice in dairy industry. In this study, we investigated the use of sensory tests for identification of sensory descriptors that characterize these samples. Sweet cheese whey (pH=6.59, nonfat dry=8.06) was added to raw milk in increasing concentrations (0, 5, 10, 15 and 20% v/v), and then submitted to sensory descriptive method (Quantitative Descriptive Method). Six sensory attributes were responsible for discrimination of samples: translucency (appearance); milk and sweetness (odour); milk, sweetness and saltiness (flavour). Principal Component Analysis (PCA) identified the attributes translucency, sweetness odour and saltiness flavour as attributes of discrimination between samples, and subsequently was used in the training panelists to detect added whey in milk. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) found that samples with a higher content of whey in its formulation (15 and 20%, respectively) showed similarity to the sample without addition of whey (0%). These results may be useful for health agencies and inspection systems for small and medium-sized municipalities, as they can get a quick response regarding this problem, minimizing the need to purchase more sophisticated equipment that would affect their limited financial budget.

Key words: cheese whey, fraud, quantitative descriptive analysis.

INTRODUCTION

The authenticity of foods is currently of major concern for researchers, consumers, industries and policy makers at all levels of the production process. Milk is a typical example

as, although this product provides several benefits to the human health (Napgál et al., 2012); it is a fairly expensive raw material. Therefore, from an economic standpoint, it could be attractive modifying the milk composition and replacing part of it with other dairy or non-dairy ingredients could seem as an attractive practice (De La Fuente and Juárez, 2005). Indeed, milk is one of the seven top foods that are adulterated, and this fact has been widely recorded (Moore et al., 2012). Recently, Souza et al. (2011) reported that commercial ultra-high temperature milks available in the Brazilian market presented at least one adulterant, such as starch, chlorine, formalin, hydrogen peroxide and urine. Moreover, the addition of cheese whey in fluid milk has already been reported elsewhere (Lasmar et al., 2011), and it is very difficult to detect such an alteration by official analytical procedures (AOAC, 2005), making it necessary to implement new experimental procedures/assays (such as Fourier Transform Infrared spectroscopy) in the routine analyses (Cassoli et al, 2011).

However, equipment and accessories involved in implementing these analytical methodologies may represent a barrier to health agencies and sectors of surveillance, mainly in developing countries, which typically have limited financial and human resources. In this sense, the use of sensory methods, particularly descriptive methods as a tool in identifying this type of fraud can be interesting and useful, as the time involved in training the panel can be readily compensated by the time speed of obtaining the results.

This work aims at determining the potential use of sensory testing to identify attributes that allow detecting adulteration of raw fluid milk intentionally added with cheese whey at different concentrations.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

The raw milk samples (18 Liters) were collected on a weekly basis on a private property in the city of Areal. The selection criterion of the property was based on a previous analysis of milk quality and permission to follow up the milking. Such monitoring was performed to avoid the addition of substances to the raw milk. After milking, the milk was immediately cooled ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$) and taken to the Veterinary Faculty of the Universidade Federal Fluminense, in Niteroi city, in the state of Rio de Janeiro.

The cheese whey used in the experimental analyses was obtained by the manufacture of fresh cheese. For this purpose, an enzymatic clotting was performed after cutting and incubation, followed by filtration (Gomes et al., 2011) using raw milk as raw material, which was acquired in a dairy farm located in Areal, Rio de Janeiro.

Sweet cheese whey ($\text{pH}=6.59$, nonfat dry=8.06) was added to raw milk (500 mL) in increasing concentrations (0, 5, 10, 15 and 20% v/v, coded M0, M5, M10, M15 and M20, respectively) and further pasteurized for $65^{\circ}\text{C}/30$ min. The temperature of 65°C was obtained in the cooker and was maintained by a water bath. The samples were stored in glass bottles, kept under refrigeration ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$) and subsequently offered to the panelists throughout the training period. Table 1 shows the description of samples and their encodings.

Sensory analyses

Tests were conducted in a standard room equipped with three individual taste booths. Samples (about 15 ml) were served at $4^{\circ}\text{C}\pm 1$ in white plastic vessels coded with three random digit numbers. Still mineral water and crackers were used as palate cleanser.

Sensory profiling

The sensory profile of each product was determined by thirteen assessors (5 women, 8 men, aged 24-32 years) who were selected and trained according to the methodology of

Quantitative Descriptive Analysis (QDA), developed by Lawless and Heymann, (2010). All of them had prior experience with quantitative descriptive analysis, and are regular consumers of fluid milk. This methodology and its established procedures have been successfully used for fluid milk products like milk with low lactose content (Adhikari et al., 2010), cheeses (Santillo et al., 2012; Wadhvani and McMahon, 2012), ice cream (Cadena et al., 2012) and functional dairy products such as probiotics, prebiotics and symbiotic yogurts (Allgeyer et al., 2010; González-Tomás et al., 2009; Gonzalez, 2010).

For descriptor selection, an initial list of terms was prepared with the information obtained from bibliography (Leonardi et al., 2011). A group of 13 assessors were asked to evaluate the suitability of these descriptors to describe the sensory characteristics of the samples according to the checklist method (Damasio and Costell, 1991). They could propose new terms after performing the repertory grid (Moskowitz, 1983), where the samples were presented in pairs, along with the sensory plug, and each taster described similarities and differences between them in relation to appearance, odour, flavour and texture. Then, two sessions of two hours were held. In these sessions, the assessors tested the samples and discussed the most suitable attributes. A list, composed of nine terms regarding appearance, odour, flavour and texture of the samples, was finally selected. The final list of descriptors, their definitions and some reference products are shown in Table 2. The intensity of each attribute was scored on a non-structured 9 cm line scale anchored as “weak” (1) at the lower end and “intense” (9) at the higher end.

The same group of 13 assessors was trained in four sessions according to the ISO 8586-1 (1993) guidelines. The first session was held with the panel leader and with all the assessors and was aimed at defining the descriptors, determining the sample evaluation procedures, and establishing the definitive scorecard. In the second and third sessions, each assessor evaluated the intensity of the nine previously selected attributes in separate booths on

five different samples. At the end of each of these sessions the panel leader and the assessors discussed the individual results obtained in order to establish consensus criteria for evaluation.

Descriptive analysis of the five samples was carried out in triplicate over six sessions and each assessor evaluated three samples per session. The reference sample together with the scorecard was presented at the beginning of each session. This process allowed the panelists to create the appropriate context for each scale. The reference sample was removed before sample evaluation. The panelists were given 30 mL of each sample in disposable cups coded with three-digit numbers in temperature of $4^{\circ}\text{C}\pm 1$. For each sample, odour attributes were evaluated first. Then, assessors were asked to evaluate visual texture, flavour, and finally, in mouth textural attributes. To reduce the influence of serving order, the samples evaluated in each session were served according to a balanced design (MacFie et al., 1989).

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) (samples and assessors) with interaction was applied to the sensory data obtained for each attribute. Individual differences among assessors were analyzed by a fixed model, considering assessors as fixed factor. When a significant interaction between assessors and sample was observed for a descriptor, a mixed model ANOVA was performed, considering assessors as random effect (González-Tomás et al., 2009, Bayarri et al., 2011). F_{sample} values were then recalculated taking the average square of the interaction as denominator. Least significant differences (LSD) between samples were determined by Fisher test ($\alpha = 0.05$). Principal Component Analysis (PCA) was also applied to the mean values of attribute intensity. Additionally, was performed Principal Component Analysis (PCA) was also applied to the mean values of the intensity of sensory attributes during the lifting QDA. This analysis was performed on a 5 x 9 matrix, which lines the

samples 5 samples and the columns 9 sensory descriptors as will be shown later. All calculations were performed with the software version XLSTAT for Windows 2012.5 (Addinsoft, Paris, France).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 3 shows the results obtained by a fixed model of two-way ANOVA with interaction, considering sources of variation samples and assessors applied to all sensory descriptors raised by the sensory panel for the QDA. The panelists reported the existence of nine sensory attributes: translucency and whiteness (appearance); milk, sweetness and boiled milk (odour); milk, sweetness and saltiness (flavour) and viscosity (texture). Significant differences were detected between samples ($p > 0.05$) for attributes: translucency, milk odour and milk flavor. Similar attributes were observed in sensory profiling of whey beverages with different levels of the whey in the formulation (Legarova and Kourimska, 2010). As expected, assessors were also an important source of variation ($p > 0.05$) in all cases, since, despite the selection and training of judges, some variability always remains due to factors such as sensitivity of individual nature and motivation as the easiness of use scales, being hardly eliminated (Naes et al., 2010).

However, it is important to know whether assessor variability may influence the estimate of sample differences. The significance, or not, of the effect of sample x assessor interaction provides information about this point. In this case, for four sensory descriptors (translucency, milk odour, milk and sweetness flavour), this interaction was significant ($p < 0.05$), indicating absence of concordance among the panel members regarding the evaluation of samples with respect to these attributes. Performing a mixed ANOVA considering samples with fixed effect and assessors as a random effect, the effect of the sample for the four previously mentioned attributes remained significant (Table 3), suggesting

that all attributes could remain in the analyses and had potential relevance for the characterization and discrimination of milk samples added with various concentrations of whey.

Table 4 shows the average values of nine sensory attributes for each sample. Generally, M0 was characterized by an increased intensity of whiteness, milk odour and milk flavour and lower intensity for boiled milk odour and saltiness flavour when compared with other samples of whey added. This finding is expected, as during the cheese-making process, most of the lactose present in the milk is transferred to the whey, as well as the soluble salts, sodium and chloride (Walstra, 2005), which influences in a decisive way the ratings of these attributes. In addition, the low thermal resistance of the whey protein is recognized, which confers a typical way of boiled milk in the product (Gallardo-Escamilla et al., 2005).

Figure 1 shows the Principal Component Analysis (PCA) performed using the means of the attributes of the QDA. We used only descriptors that showed significant differences between the samples, and thus excluded attributes whiteness, boiled milk odour and viscosity. Using only two principal components reported 98.30% of the variability. The samples M0 and M15 are characterized by attributes milk odour, milk and sweetness flavour, while samples M5, M10 and to a lesser extent, M20 are characterized by attributes sweetness odour, saltiness flavor and translucency. These attributes should be selected and taken into account in the training panelists to detect milk with added whey, using cheeses as stimulus whey of different dairy and collected at different times, the influence of these factors on the composition of whey (Johansen et al., 2002). These results may be useful for health agencies and inspection systems for small and medium-sized municipalities, as they can get a quick response regarding this problem, minimizing the need to purchase more sophisticated equipment that would affect their limited financial budget.

Figure 2 shows the analysis of the dendrogram resulting from the application of hierarchical cluster analysis (HCA) for verification of similarity between samples, displayed a confirmation of existing results in the PCA. Note the existence of three segments: the first containing samples M0 and M15, second containing the sample M20 and the third containing the samples M5 and M10. The formation of the groups observed in the dendrogram justifies the increased incidence of fraudulent practice, inasmuch as the control sample without whey (M0) was placed near the sample with higher whey, M15 and M20, suggesting that they are perceived similarly in sensory standpoint.

CONCLUSION

These results suggest that sensory methods, in particular the quantitative descriptive analysis, can significantly contribute to fraud detection of cheese whey in milk, offering a quick response to solving this problem. In particular, emphasis should be given to the attributes translucency, sweetness (odour) and saltiness (flavor), which were the main attributes that must be taken into account in future studies and training of panelists. Further studies should consider the use of methodologies such as dynamic time-intensity methodology to determine how these attributes are perceived by consumers during their intake.

REFERENCES

- Adhikari, K., L. M. Dooley, E. Chambers IV and N. Bhumiratana. 2010. Sensory characteristics of commercial lactose-free milks manufactured in the United States. *LWT-Food Sci. Technol.* 43: 113-118.
- Allgeyer, L. C., M. J. Miller and S. Y. Lee. 2010. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *J. Dairy Sci.* 93: 4471-4479.

- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, 18th ed. Gaithersburg, Mariland, 2005.
- Bayarri, S., I. Carbonell, E. X. Barrios, E. Costell. 2011. Impact of sensory differences on consumer acceptability of yoghurt and yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* 21: 111-118.
- Cadena, R. S., A. G. Cruz, J. A. F. Faria and H. M. A. Bolini. 2012. Reduced fat and sugar vanilla ice creams: Sensory profiling and external preference mapping. *J. Dairy Sci.* 95: 4842-4850.
- Canto, A. C. V. C. S., B. R. C. C. Lima, A. G. Cruz, C. A. Lázaro, D. G. C. Freitas, J. A. F. Faria, R. Torrezan, M. Q. Freitas and T. P. J. Silva. 2011. Effect of high hydrostatic pressure on the color and texture parameters of refrigerated Caiman (*Caiman crocodilus yacare*) tail meat. *Meat Sci.* 91: 255-260.
- Cassoli, L. D., B. Sartori, A. Zampar and P. F. Machado. 2011. An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *Int. J. Dairy Technol.* 64: 480–485.
- Damasio, M. H. and E. Costell. 1991. Análisis sensorial descriptivo: Generación de descriptores y selección de catadores. *Rev. Agroq. Tec. Al.* 31:165-178.
- De La Fuente, M.G. and M. Juarez. 2005. Authenticity Assessment of Dairy Products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:563–585
- Gallardo-Escamilla, F. J., A. L. Kelly and C. M. Delahunty. 2005. Sensory characteristics and related volatile flavor compound profiles of different types of whey. *J. Dairy Sci.* 88: 2689-2699.
- Gomes, A.P., A.G. Cruz, R.S. Cadena, R.M.S. Celeghini, J.A.F. Faria, H.M.A. Bolini, M.A.R. Pollonio and D. Granato. 2011. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. *J. Dairy Sci.* 94: 2701-2706.

- Gonzalez, N. J., K. Adhikari, K. and M. F. Sancho-Madriz. 2010. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and symbiotics. *LWT- Food Sci. Technol.* 44: 158-163.
- González-Tomás, L. M., S. Bayarri, and E. Costell. 2009. Inulin-enriched dairy desserts. Physicochemical and sensory aspects. *J. Dairy Sci.* 92: 4188–4199.
- ISO 8586-1. 1993. Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part I. Selected assessor. Geneva. Switzerland
- Johansen, A. G., G. E. Vegarud and S. Skeie. 2002. Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *Int. Dairy J.* 12: 621-629.
- Lasmar, M. M., M. O. Leite, M. R. Souza, M. M. O. P. Cerqueira, C. F. A. Penna, C. N. B. Couto and J. M. Ferreira. 2011. Detection of cheese whey in raw milk preserved with bronopol through high performance liquid chromatography. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 63: 1-4.
- Lawless, H. T. and H. Heymann. 2010. Sensory evaluation of food. Principles and practices. (2nd edition). New York: Springer.
- Legarova, L. and L. Kourimska. 2010. Sensory quality evaluation of whey beverages. *Mijekarstvo* 60: 280-287.
- Leonardi, A. N., S. G. Caniatti-Brazacca, V. Arthur. 2011. Disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 31,1:31-40.
- MacFie, H. J., H. Bratchell, K. Greenhoff, and L. V. Vallis. 1989. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in Hall tests. *J. Sens. Studies.* 4: 129–148.

- Moore, J. C., J. Spink and M. Lipp. 2012. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* 77: 118- 126.
- Moskowitz, H. R. 1983. *Product testing and sensory evaluation of foods*. Westport: Food and Nutrition Press. 605 p.
- Naes, T., P. Brockhoff and O. Tomic. 2010. *Statistics for Sensory and Consumer Science*. West Sussex: United Kindow.
- Napgal, R., P. V. Behare, M. Kumar, D. Mohania, M. Yadav, S. Jain, S. Menon, O. Parkash, and H. Yadav. 2012. Milk, Milk Products, and Disease Free Health: An Updated Overview. *Rev. Food Sci. Nut.* 52: 321-333.
- Santillo, A., M. Caroprese, D. Ruggieri, R. Marino, A. Sevi and M. Albenzio. 2012. Consumer acceptance and sensory evaluation of Monti Dauni Meridionali *Caciocavallo* cheese. *J. Dairy Sci.* 95: 4203-4208.
- Souza, S. S., A. G. Cruz, E. H. M. Walter, J. A. F. Faria, R. M. S. Celeghini, M. M. C. Ferreira, D. Granato, A. S. Sant'Ana. 2011. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. *Food Chem.* 124:692–695. doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.074
- Wadhvani, R. and D. J. McMahon. 2012. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. *J. Dairy Sci.* 95: 2336-2346.
- Walstra, P., J. T. M. Wouters and T. J. Geurts. 2005. *Dairy Science and Technology*, Second Edition. Boca Ranton: CRC Press.

Table 1. Samples description

Code	Sample
M0	Milk without addition of whey
M5	Milk with 5% cheese whey
M10	Milk with 10% cheese whey
M15	Milk with 15% cheese whey
M20	Milk with 20% cheese whey

Table 2. Definitions of descriptive terms used as references extreme intensity scale in intact sensory evaluation of milk and milk adulterated with different percentages of whey (5, 10, 15 and 20% v/v).

Descriptive Terminology		
Attribute	Definition	Reference Product
Appearance		
Translucency	Ability to overcome the light	Shortly: milk concentrate with 10% milk powder Intense: cheese whey
Whitness	Color white presented by milk	Shortly: cheese whey Intense: milk with 10% cornstarch
Odour		
Typical	Characteristic odour of milk	Shortly: milk diluted with 75% water Intense: milk concentrate with 10% milk powder
Sweetness	Characteristic odour substances Sugar added	Shortly: milk diluted with 75% water Intense: milk with 50% condensed milk
Boiled Milk	Odor associated with cooked milk heated milk	Shortly: milk diluted with 50% water Intense: boiled milk
Flavour		
Typical	Characteristic flavour of milk	Shortly: cheese whey diluted with 50% water Intense: milk concentrate with 10% milk powder
Saltiness	Flavour caused by solutions aqueous sodium chloride solution	Shortly: cheese whey diluted with 50% water Intense: milk with 0.1% sodium chloride
Sweetness	Flavour caused by solutions aqueous sugar and sweeteners	Shortly: cheese whey diluted with 50% water Intense: milk with 1% sugar
Texture		
Viscosity	What is mistletoe	Shortly: milk diluted with 50% water Intense: milk concentrate with 10% milk powder

Table 3. Two-way ANOVA of sensory attributes scores of fluid milk and milk adulterated with different percentages of whey (5, 10, 15 and 20%). 13 assessors, 5 samples, 6 replicates) F ratio values^a.

Attribute	Sample ^b	Sample x		
		Assessors	Assessors	Sample ^c
Appearance				
whitness	1.12 ^{ns}	19.19*		
translucency	2.38*	14.32*	1.54*	2.15*
Odour				
typical	3.16*	21.5*	2.02*	2.62*
swetness	1.362*	17.62*	1.15*	1.12*
boiled milk	0.65 ^{ns}	14.14*	1.06 ^{ns}	
Flavour				
typical	3.46*	20.04*	1.72*	3.03*
swetness	1.59*	21.9*	1.46*	1.83*
saltiness	1.71*	6.01*	1.15 ^{ns}	
Texture				
viscosity	1.87 ^{ns}	12.76*		

^a An asterisk (*) indicates significant at $\alpha < 0.05$; ns=not significant.

^b Calculated using the mean square error as denominator.

^c Calculated using the mean square of interaction term as denominator.

Table 4. Mean values of sensory attributes and corresponding Fisher's significant difference for samples^a.

Atributo	Amostras				
	M0	M5	M10	M15	M20
Aparência					
whitiness	6.469 ^a	6.269 ^a	6.273 ^a	6.738 ^a	6.321 ^a
translucency	2.025 ^{ab}	2.698 ^b	2.238 ^{ab}	1.771 ^a	2.140 ^{ab}
Odor					
typical	6.788 ^{ab}	6.071 ^a	6.284 ^{ab}	6.886 ^b	6.600 ^{ab}
swetness	3.563 ^c	4.244 ^a	3.923 ^b	3.546 ^c	3.646 ^c
boiled milk	1.480 ^a	1.748 ^a	1.619 ^a	1.803 ^a	1.790 ^a
Sabor					
typical	6.984 ^{ab}	6.301 ^c	6.550 ^{ab}	7.273 ^a	6.825 ^{ab}
swetness	1.776 ^c	3.086 ^a	2.344 ^b	1.851 ^c	2.111 ^b
saltiness	4.101 ^a	3.650 ^b	3.696 ^b	4.040 ^a	3.975 ^a
Textura					
viscosity	3.646 ^a	3.678 ^a	3.388 ^a	3.882 ^a	3.353 ^a

^a Identification of samples is as given in Table 1. Means within a row with common superscripts not differ significantly ($\alpha < 0.05$).

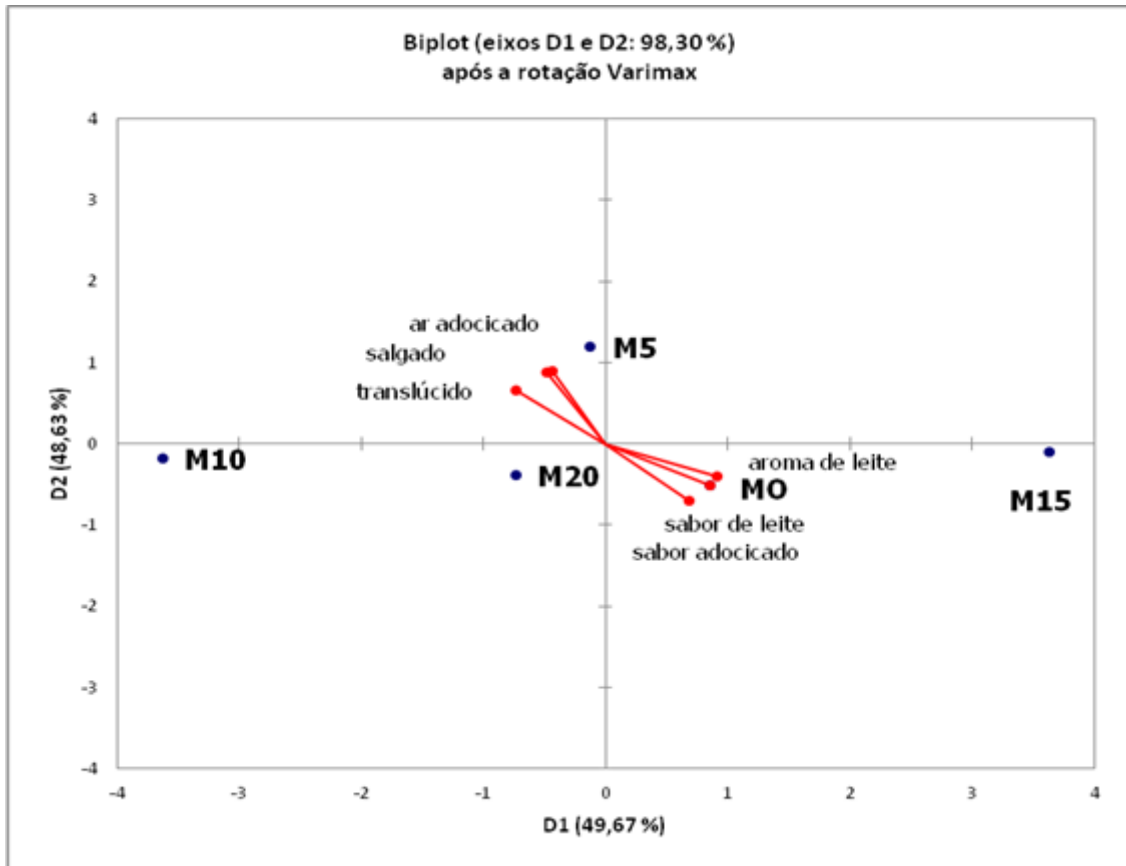


Figure 1. Principal component Analysis (PCA) of fluid milk and milk adulterated with different percentages of sweet whey (5, 10, 15 and 20% v/v). Identification of samples is as given in Table 1.

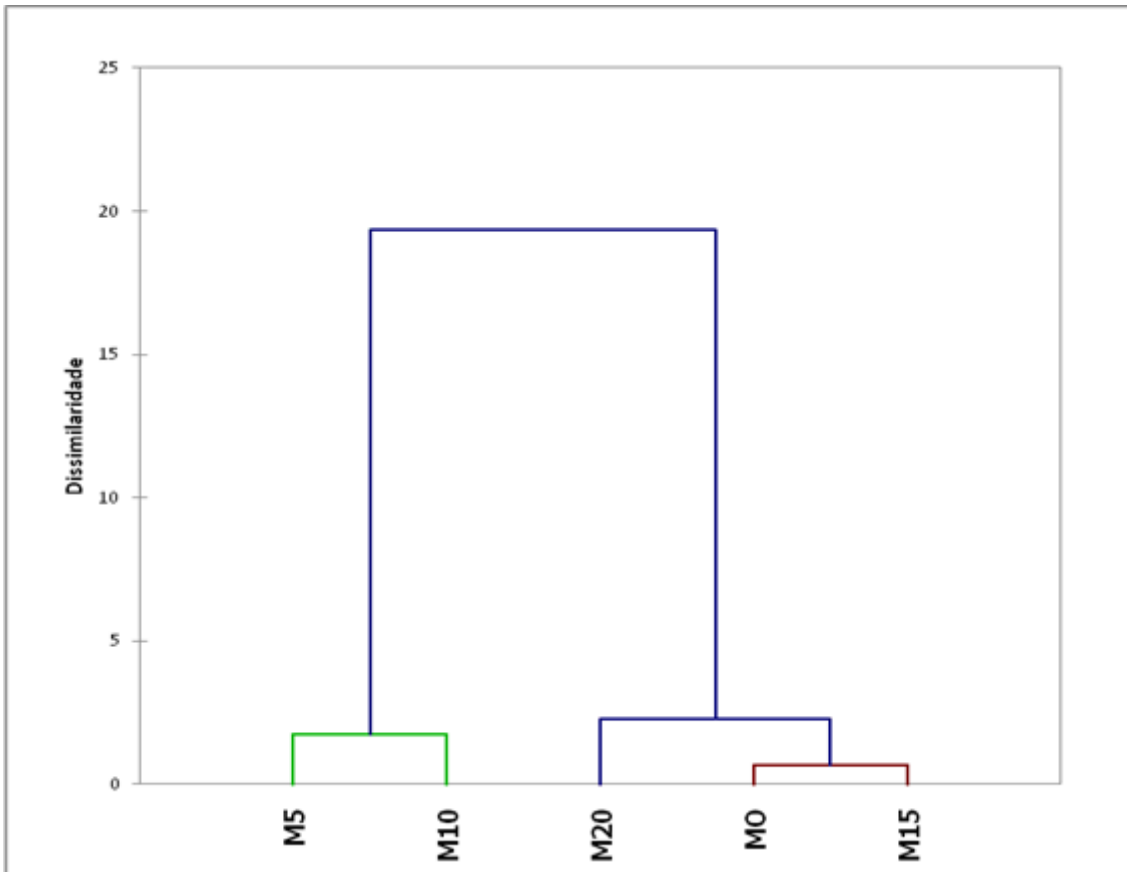


Figure 2. Dendrogram of fluid milk and milk adulterated with different percentages of sweet whey (5, 10, 15 and 20% v/v). Identification of samples is as given in Table 1.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que as análises oficiais não são eficazes na identificação da fraude com soro de queijo em leite, pois as variações encontradas não são específicas para este tipo de fraude. Ao se comparar a ASL e a eletroforese SDS-Page, ambas se mostraram sensíveis quando comparadas com a amostra controle. Entretanto, pela constante variação encontrada nos valores de ASL durante o período de estocagem, não é possível estabelecer limites fixos de concentração que permitam a padronização na identificação da fraude. A eletroforese SDS-Page se mostrou mais eficaz por não depender somente da concentração de GMP, e sim da identificação da α_1 e β caseínas e da β lactoglobulina no gel de poliacrilamida. Os métodos sensoriais, em especial, a análise descritiva quantitativa, podem contribuir de forma significativa para detecção de fraudes com soro de queijo em leite, oferecendo uma resposta rápida para a identificação deste problema.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGE/ MAPA – Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura. Projeções do Agronegócio Brasil 2009/10 a 2019/20. Brasília, 2010, 50p.

AIMUTIS, W. R. Bioactive Properties of Milk Proteins with Particular Focus on Anticariogenesis. *The Journal of Nutrition*, v. 134, n. 4, p.989S-995S, 2004.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21, n.2, p.187–192, 2001.

AMAYA, L. M. G.; COLMENARES, E. V.; VILLARROEL, E. R. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por page-sds como índice de adulteración de leche. *Revista Científica, FCV-LUZ*, v.XVI, n.3, p.308 - 314, 2006.

ANEMA, S. G. The use of "lab-on-a-chip" microfluidic SDS-PAGE electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. *International Dairy Journal*, v.19, n.4, p.198-204, 2009.

BARBOSA A. S.; FLORENTINO E. R.; FLORÊNCIO I. M.; ARAÚJO A. S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. Grupo Verde de Agricultura Alternativa (GVAA), v.5, n.1, p.07 – 25, 2010.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. *Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. Florianópolis, 2009. 1 CD ROM.

BORGES, K. A.; PINTO, A. T. Variações no índice crioscópico de amostras de leite recebidas na plataforma de um laticínio, no período de janeiro a agosto de 2007. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 35., 2008, Gramado. *Trabalhos do 35o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 2008.

BORGES, K. A.; REICHERT, S.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V. Avaliação da qualidade do leite de propriedades da região do Vale do Taquari no estado do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae* (UFRGS. Impresso), v. 37, p. 39-44, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa, *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, p.8, 14 dezembro de 2006. Seção I.

BURNS; E. W. C. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Second Edition. New York: Marcel Dekker, 2001. p.729–782, v. 27.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; ALCÂNTRA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. *Revista Electonica de Veterinaria*, v.8, n.6, 2007.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia Técnico Ambiental da Indústria de Produtos Lácteos. *Série P+L*, 95p., 2008.

CHAVES, K. F.; CALLEGARO, E. D.; SILVA, V. R. O. Utilização do soro de leite nas indústrias de laticínios da região de Rio Pomba-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 27., 2010, Juiz de Fora. *Anais do Congresso Nacional de Laticínios*. Juiz de Fora: EPAMIG/ ILCT, 2010. 1 CD-ROM

CRISCIONE, A.; CUNSOLO, V., BORDONARO, S., GUASTELLA, A. M.; SALETTI, R.; ZUCCARO, A.; D'URSO, G.; MARLETTA, D. Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *International Dairy Journal*. n.19, p.190-197, 2009.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Proteínas alimentarias: biquímica, propiedades funcionais, valor nutricional, modificaciones químicas. Zaragoza: Ed. Acribia, 1989, p.179-216.

CRUZ, E. N.; SANTOS, E. P. Aguagem do leite: métodos básicos de identificação. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO A DOCÊNCIA, XI., Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrarias/Departamento de Tecnologia Rural/Monitoria. UFPB-PPG. 2008.

DAHMER, A. M. *Avaliação da gestão da qualidade na indústria de leite do Estado de Mato Grosso do Sul*. 2006. p.218. Dissertação (Mestrado em Economia e Administração) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso. 2006.

DUTCOSKY, S. D. *Análise Sensorial de Alimentos*. 2ed. revista e ampliada. Curitiba: Champagnat, 2007. Cap. 1: Histórico da Análise Sensorial. p.23. 239p. Coleção Exatas., apud AMERINE, M. A.; PANGBORN, R. M.; ROESSLER, E. B. Principles of sensory evaluation of food. New York: Academic Press, 1965.

FAPRI – Food and Agricultural Policy Research Institute. Disponível em: www.fapri.org. Acesso: dezembro de 2012.

FARIA, E. F.; RODRIGUES, I. C.; BORGES, R. V. *Estudo do impacto ambiental gerado nos corpos d'água pelo efluente da indústria de laticínio em Minas Gerais*. 2004. 86 f. Dissertação (Especialização em Engenharia Sanitária e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2004.

FEAM (Fundação Estadual do Meio Ambiente), 2003. Lei Federal 14.940, de 29 de dezembro de 2003. Taxa de Controle e Fiscalização Ambiental (TFAMG) das atividades potencialmente poluidoras e utilizadoras de recursos naturais. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2003.

FITZSIMONS, S. M.; MULVIHILL, D. M.; MORRIS, E. R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, v.11, n.4, p.62-69, 2006.

FONSECA, V. Detecção de digital espectral é opção para análise segura e rápida contra fraudes no leite. *FAPEMIG Minas Faz Ciência*, n.34, 2008.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Milk proteins. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Blackie Academic & Professional, 1998. cap. 4 e 5, p. 146-264.

FUENTE, M. A.; JUAREZ, M. Authenticity Assessment of Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.563–585, 2005.

FUKUDA, S. P. *Estudo da correlação entre o método na ninidrina ácida e a cromatografia líquida de alta eficiência para a dosagem de glicomacropéptido e caseinomacropéptido em leite*. Campinas, 2003. 149p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

FUKUDA, S. P. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *INRA, EDP Sciences*, n.84, p.501–512, 2004.

FURTADO, M. M.; POMBO, A. F. W. Fabricação de queijo prato e minas: estudo do rendimento. *Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes*, v.34, p.3-19, 1979.

GALLAGHER, S. R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins UVP, Inc., Upland, California; Publication Name: Current Protocols in Cell Biology; Unit 6.1; 2007

GONZÁLEZ, C. P.; AYALA, A. R.; TOLENTINO, R. G.; FLORES, G. P.; LEÓN, S. V. Detección de suero de quesería en leches ultrapasteurizadas mexicanas mediante la cuarta derivada del espectro de absorción. *Veterinaria Mexico*, v.39, n.1, 2008.

GUIMARÃES, F. Consumo de leite aumenta a cada ano. Notícia publicada na edição de 24/06/2012 do Jornal Cruzeiro do Sul, na página 003 do caderno B - edição impressa na internet. Disponível em: <http://www.cruzeirodosul.inf.br/acessarmateria.jsf?id=397387>. Acesso: dezembro de 2012

GUINEE, T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v.45, n.4, p.94-104, 1992.

HEMME et al. IFCN Dairy Report 2010, International Farm Comparison Network, IFCN Dairy Report Center, Kiel, Germany. 2010.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário. SIDRA. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br. Acesso: dezembro 2012.

KAISER, K. K.; KRAUSE, I. Analytik von Proteinen in Lebensmittel in mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, Berlin, v.180, n.3, p.181-201, 1985.

KARTHEEK, M.; SMITH, A. A.; MUTHU, A. K.; MANAVALAN, R. Determination of Adulterants in Food: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v.3, n.2, p. 629-636, 2011.

KOSKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*, v.62, p.1149-1160, 1979.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, n.227, p.680-685, 1970

LAGRANGE, V.; DALLAS, P. Produtos de soro dos EUA: disponibilidade, recursos tecnológicos, aplicações. *Engenharia de Alimentos*, v.15, n.2, p.27-29, 1997.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, v.16, p. 648–654, 2006.

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

MARTINS, P. C. A Hora e a vez do leite de qualidade. *Revista Balde Branco* - 489A. Chefe Geral da Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora – Minas Gerais. 2006.

MARTINS, F. O. Avaliação da composição, da qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em leite UHT. Disponível em: www.terraviva.com.br/IICBQL/p043. Acesso em 13 de out de 2011.

MIRALLES B.; BARTOLOMÉ B.; AMIGO L.; RAMOS M. Comparison of three methods to determine the whey protein to total protein ratio in milk. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.2759-2765, 2000.

MONTÁNEZ, C. D. A.; RAMÍREZ, J. R.; ARANGO, C. J. J.; BETANCOURT, S. D. P. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración com suero de quesería em leche deshidratada. *Veterinaria Mexico*, v.31, n.3, 2000.

PINTO, C. Detección de sólidos totales de suero de quesería em leche pasteurizada y leche em polvo por electroforésis em gel de poliacrilamida-SDS. *Alimentarium*, v.16, n.3, p.23-31. 1991.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; CASTRO-GOMES, R. J. Soro de leite: obtenção, características e aproveitamento: revisão. *Semina Ciência Agrícola*, v.13, n. 1, p. 92-96, 1992.

PRATA, L. F.; PRATA, C. B. Determinação de GMP e CMP no leite por métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) – parâmetros metodológicos. *Archives of Veterinary Science*, v.17, n.2, p.29-39, 2012.

RECIO, I.; GARCÍA-RISCO, M. R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; RAMOS, M. Detection of rennet whey solids in UAT milk by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, n.10, p.333-338, 2000.

ROSAS, R. *Implementación de dos técnicas de detección de suero de quesería como adulterante de leche deshidratada por espectrofotometría y por electroforesis en gel de poliácridamida-SDS*. México, 1997. 39p. Tese (Tesis de Grado). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 1997.

SCHRÖDER, S.; ZHANG, H.; YEUNG, E. S.; JÄNSCH, L.; ZABEL, C.; WÄTZIG, H. Quantitative Gel Electrophoresis: Sources of Variation. *Journal of Proteome Research*, v.7, p.1226–1234, 2008.

SHAMMET, K. M.; BROWN, R. J.; MAHON, D. J. Mc. Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on k-casein. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.1373-70, 1992.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.1, 2008.

SILVA, A.C.O.; HOOD, C.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T.; BALTHAZAR, C. F. Detecção de fraudes em leite beneficiado e verificação dos métodos analíticos para análise de leite fluido. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES, XX. 2010. Niterói: PROPPI UFF, 2010.1 CD-ROM.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico-química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção direta de vapor. *Ciências Agrotécnicas*, v.27, n.6, p.1340-1347, 2003.

STEPHAN, M. P. Estudos iniciais de utilização de eletroforese (SDS-PAGE) para avaliação de fraude em produtos comercializados como concentrado de soro de queijo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.61, n.351, p.214-217, 2006.

STONE, H.; SIDEL, J. L. *Sensory evaluation practices*. 2ed. San Diego: Academic Press, 1993.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em varias regiões do estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.243-250, 2008.

TRONCO, V. M. Controle Físico-Químico do Leite. In: TRONCO, V. M. *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. Santa Maria, RS: UFSM, 1997. Cap. V, p. 103 – 105.

XIONG, Y. L.; GOWER, M. J.; LI, C.; ELMORE, C. A.; CROMWELL, G. L.; LINDEMANN, M.D. Effect of dietary ropamine on tenderness and postmortem protein degradation of pork muscle. *Meat Science*, v.73, n.4, p.600-604, 2006.

YAO K.; UBUKA T.; MASUOKA N.; KINUTA M.; IKEDA T. Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*. v.179, p.332–335, 1989.

ZADOW, J. G. *Modern Dairy Technology: Advances in Milk Processing*. London: Elsevier, 1997. v.2.

6 APÊNDICES

6.1 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO: APLICAÇÃO DA TÉCNICA DO ÁCIDO SIÁLICO E ELETROFORESE SDS-PAGE NA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE CRU

Dear Miss Leticia Aquino:

Your manuscript titled "Applying the sialic-acid and SDS-Page techniques to identify adulteration of milk with cheese whey" by Aquino, Leticia; Cruz, Adriano; Conte, Carlos; Silva, Adriana; Alves, Vinicius; Hood, Carolina; Costa Lima, Bruno; Canto, Anna has been successfully submitted online and is presently being given consideration for publication in the Journal of Dairy Science. Because publication in the Journal of Dairy Science requires the time and expertise of at least 2 reviewers, all manuscript authors have a responsibility to review submissions from other authors. We hope that you will help the journal and fulfill this obligation if asked by editors.

Please mention the manuscript ID (JDS-13-6661) in all correspondence or when calling the office with questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds> and edit your user information as appropriate. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>.

Please complete and return the attached copyright release form to the editorial office by fax ([217-378-4083](tel:217-378-4083)) or e-mail (journals@assochoq.org). If authors are at more than one institution, separate forms may be filed by each author. All author signatures are required, but revised manuscripts do not require new signatures from authors unless a signature from a given author has not already been provided.

Failure to return the form will delay the publication process if your paper is accepted for publication.

Sincerely,

Journal of Dairy Science Editorial Office

6.2 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO: ANÁLISE SENSORIAL COMO FERRAMENTA NA IDENTIFICAÇÃO DA FRAUDE COM SORO DE QUEIJO EM LEITE FLUIDO

Dear Dr. Adriano Cruz:

Your manuscript titled "Detection addition of cheese whey in milk: the Quantitative descriptive analysis can be useful?" by Cruz, Adriano has been successfully submitted online and is presently being given consideration for publication in the Journal of Dairy Science. Because publication in the Journal of Dairy Science requires the time and expertise of at least 2 reviewers, all manuscript authors have a responsibility to review submissions from other authors. We hope that you will help the journal and fulfill this obligation if asked by editors.

Please mention the manuscript ID (JDS-13-6647) in all correspondence or when calling the office with questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jds> and edit your user information as appropriate. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jds>.

Please complete and return the attached copyright release form to the editorial office by fax ([217-378-4083](tel:217-378-4083)) or e-mail (journals@assochoq.org). If authors are at more than one institution, separate forms may be filed by each author. All author signatures are required, but revised manuscripts do not require new signatures from authors unless a signature from a given author has not already been provided.

Failure to return the form will delay the publication process if your paper is accepted for publication.

Sincerely,

Journal of Dairy Science Editorial Office