

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS  
DE ORIGEM ANIMAL

CAROLINA HOOD WANDERLEY

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE

NITERÓI, RJ

2014

CAROLINA HOOD WANDERLEY

**AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE**

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

Orientadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. ADRIANA CRISTINA DE OLIVEIRA SILVA

Coorientador:

Prof. Dr. CARLOS ADAM CONTE JÚNIOR

Niterói, RJ

2014

CAROLINA HOOD WANDERLEY

**AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS PARA  
DETECÇÃO DE FRAUDES EM LEITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Adriana Cristina de Oliveira Silva – UFF  
Orientadora

---

Prof. Dr. Carlos Adam Conte Júnior – UFF  
Coorientador

---

Prof. Dr. Mêsar Lemos - UFF

Niterói, RJ

2014

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que me apoiaram durante todo o meu mestrado. Aos grandes amigos que fiz durante todo o curso, principalmente à Letícia, Laís, Marion, Celso, Hugo, Karol, Cristine, Bruninhas, Guilherme e todos os outros que tenho certeza que esqueci. Amigos que estiveram do meu lado ouviram o meu desabafo, me apoiaram em vários momentos difíceis e me encheram de alegria. Espero que todos tenham um futuro incrível pela frente.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Adriana e ao meu coorientador Prof. Carlos, que me ensinaram muito durante todo o período. Tenho certeza que muito do que eu alcancei profissionalmente e pessoalmente até agora tem uma boa parcela da ajuda de vocês.

À minha família que me apoiou durante toda a minha vida, estando sempre do meu lado seja qual fosse a minha escolha.

Aos meus pais e minhas irmãs. Por me ajudarem em todos os momentos, seja ouvindo minhas conversas, que muitas vezes eram bem chatas, seja me ajudando a solucionar problemas que não estava conseguindo encontrar uma solução.

No entanto, devo agradecer principalmente ao meu amigo e namorado, Luis, por todo o suporte, ajuda, apoio, carinho, atenção e amor. Obrigada pela sua paciência eterna comigo. Amo você.

Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo fomento que me proporcionou a tranquilidade necessária para o prosseguimento adequado da pesquisa.

À universidade Federal Fluminense (UFF) e a Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis (PROAES) pelo suporte a participação de eventos acadêmicos.

## RESUMO

Relatos de fraudes em leites são frequentemente documentados em todo o mundo. No presente estudo foram avaliadas as alterações dos métodos analíticos oficiais de rotina (AO) (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, densidade relativa a 15°C, alizarol e crioscopia) e avaliada a sensibilidade das metodologias oficiais para a detecção de fraudes (DF), após adição em diferentes concentrações, de substâncias comumente utilizadas para adulterar o leite bovino (amido de milho, sal, cloro, água e neutralizantes da acidez). Em paralelo com as análises oficiais do leite bovino foi realizada a pesquisa de substâncias adulterantes em 30 marcas de leite UAT e 15 marcas de leite pasteurizado, comercializados no estado do Rio de Janeiro. Também foram avaliadas as técnicas de eletroforese SDS-Page na detecção qualitativa e quantitativa de leite caprino e ovino fraudados com diferentes concentrações de leite bovino. Foi verificado, ainda, se os parâmetros físico-químicos utilizados nas metodologias analíticas nacionais e internacionais para verificação de qualidade no leite caprino e ovino, respectivamente, eram capazes de identificar a adulteração. Após a fraude artificial com amido de milho, sal (NaCl), cloro (Cl), água e bicarbonato de sódio foram realizadas as AO e as DF. Foi detectada fraude nas DF, em quantidades iguais ou maiores que: 0,25% de amido de milho, 0,06% de sal, 0,4% de cloro, 0,4% de água e 0,06% de bicarbonato de sódio. Utilizando as porcentagens mínimas detectadas nas DF, foi observadas alterações das AO do leite bovino para as fraudes com água, sal, bicarbonato de sódio e cloro. No entanto, não foi possível detectar alterações no leite fraudado com amido de milho. Ao analisar o leite coletado no comércio varejista verificou-se que, 83,3% (25) das marcas do leite UAT e apenas 6,66% (1) do leite pasteurizado obtiveram valores compatíveis com a qualidade preconizada, considerando os limites propostos pela legislação. Nos leites caprino e ovino fraudados com diferentes concentrações de leite bovino, nenhuma diferença nos parâmetros físico-químicos foi observada, quando comparados às amostras controle de cada espécie ( $p < 0.05$ ) e as amostras fraudadas, independentemente do nível da fraude. Pela eletroforese SDS-Page foi verificado um aumento ( $p < 0,05$ ) da  $\alpha$ s1-caseína após adição de 0,5% e 5% de leite de vaca nos leite de cabra e ovelha, respectivamente. O limite de detecção da porção  $\beta$ -caseína foi maior em ambos os leites (10% no leite caprino e 25% no leite ovino). A técnica de eletroforese SDS-Page mostrou ser eficaz para estimar o percentual de leite bovino adicionado ao leite caprino e ovino, além de demonstrar que a  $\alpha$ s1-caseína é a proteína mais apropriada na detecção desta fraude.

**Palavras-chave:** Fraude. Leite bovino, caprino e ovino. Eletroforese.

## ABSTRACT

Reports of fraud in milks are often documented worldwide. In the present study the changes of official routine analytical methods (AO) ( lipids, total solids, titratable acidity, relative density at 15°C, alizarol and freezing point ) and evaluated the sensitivity of the official methods for detecting fraud (DF) were evaluated after addition at different concentrations of substances commonly used to adulterate bovine milk (starch, salt, chlorine, water and neutralizing the acidity). In parallel, 30 brands of UHT milk and 15 brands of pasteurized milk, marketed in the state of Rio de Janeiro were analyzed by the AO and DF. The SDS-Page electrophoresis technique was also evaluated for the qualitative and quantitative detection of fraud in goat and sheep milk with different concentrations of bovine milk. It was also verified if the physicochemical parameters used in the official analytical methods for evaluate the quality in goat and sheep milk were able to identify the adulteration. After the artificial fraud with starch, salt (NaCl), chlorine (Cl), water and sodium bicarbonate the AO and DF were performed. In DF analyses were detected an equal amount or greater than: 0.25% of starch, 0.06% of salt, 0.4% of chlorine, 0.4% of water and 0.06% of sodium bicarbonate. Using the same minimum percentages observed in DF, were verified changes in the AO of water, salt, sodium bicarbonate and chloride analysis. However, it was not possible to detect changes in the milk adulterated with corn starch. In the milk collected at the market was detected that 83.3% (25) of UHT brands and only 6.66% (1) of pasteurized milk were in agreement with the quality recommendation considering the limits proposed by the legislation. In goat and sheep milk frauded by different concentrations of bovine milk, no differences in physicochemical parameters was observed when compared to the control samples of each species ( $p < 0.05$ ) and rigged samples, regardless of the level of fraud. For SDS-Page, there was an increase ( $p < 0.05$ ) in  $\alpha_1$ -casein after the addition of 0.5% of cow milk in goat milk and 5% of cow milk in sheep milk. The detection limit of the portion of  $\beta$ -casein was higher in both milks (10% in goat milk and 25% in sheep milk). The technique of SDS-Page showed that  $\alpha_1$ - casein protein is most suitable for the detection the fraud with cow milk as in goat as in sheep milk, and is effective to estimate the percentage of this adulteration.

**Keywords:** Fraud. Cow, goat and sheep milk. SDS-Page electrophoresis.

## **SUMÁRIO**

**RESUMO**, f. 5

**ABSTRACT**, f. 6

**SUMÁRIO**, f. 7

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**, f. 9

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**, f. 10

**1 INTRODUÇÃO**, f. 12

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, f. 14

2.1 MERCADO LÁCTEO BRASILEIRO, f. 14

2.2 PRINCIPAIS DEFERENÇAS ENTRE O LEITE BOVINO, CAPRINO, OVINO, f. 16

**2.2.1 Leite bovino**, f. 17

**2.2.2 Leite caprino**, f. 19

**2.2.3 Leite ovino**, f. 20

2.3 FRAUDES EM LEITE, f. 21

2.4 METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE, f. 22

**2.4.1 Análises oficiais**, f. 22

**2.4.2 Identificação de fraude em leite bovino**, f. 23

**2.4.3 Identificação de fraude por mistura de leites de diferentes espécies**, f. 24

2.4.3.1 *Eletroforese*, f. 24

2.4.3.1.1 *Eletroforese SDS-Page*, f. 25

**3 DESENVOLVIMENTO**, f. 26

3.1 ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA VERIFICAR FRAUDE EM LEITE FLUIDO. Publicado na Revista Ciências da Vida, v. 32, n. 2, p. 34-42, 2012, f. 26

3.2 ARTIGO 2: DETECTION OF ADULTERATION IN GOAT AND SHEEP MILK WITH COW MILK BY SDS-PAGE ELECTROPHORESIS AND ITS RELATIONSHIP WITH PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS OF QUALITY. Submitted to Journal of Dairy Science, f. 39

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**, f. 58

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, f. 59

**6 APENDICES FINAIS, f. 67**

6.1 ARTIGO PUBLICADO: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA VERIFICAR FRAUDE EM LEITE FLUIDO, f. 66

6.2 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO: DETECTION OF ADULTERATION IN GOAT AND SHEEP MILK WITH COW MILK BY SDS-PAGE ELECTROPHORESIS AND ITS RELATIONSHIP WITH PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF QUALITY, f. 75



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Produção brasileira de leite e participação das regiões do país na produção, f. 14

Quadro 2. Importações brasileiras dos principais derivados lácteos (US\$ mil), f. 15

Quadro 3. Composição centesimal do leite bovino, caprino e ovino, f. 17

Quadro 4. Aquisição per capita de derivados lácteos, em equivalente litros de leite, f. 18

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGE - Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura

AM – Amido de Milho

ANOVA – Análise de Variância

AO – Método Analítico Oficial de Rotina

BS – Bicarbonato de Sódio

Cl – Cloro

DF - Metodologias Oficiais Para A Detecção De Fraudes

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária

ESD- Extrato Seco Desengordurado

EST – Extrato Seco Total

FAO – Food and Agriculture Organization

g – Gramas

H<sub>2</sub>O – Água

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN – Instrução Normativa

kDa – Kilodalton

Kg – Kilogramas

L – Litro

mA - Miliampere

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDIC – Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

mL – Mililitro

mM – Micromolar

N – Valores Normais

NaCl – Cloreto de Sódio (Sal)

nm – Nanómetro

ONU - Organização das Nações Unidas

Page – Polycramide gel electrophoresis

PCR - Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial Hidrogeniônico

RCF - Relative Centrifugal Force

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

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE – Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida

SIE – Sistema de Inspeção Estadual

SIF - Serviço de Inspeção Federal

SNG – Sólidos Não Gordurosos

UAT – Ultra Alta Temperatura

UHT - Ultra-High Temperature

US\$ - Dólares Americanos

V – Voltagem

μL - Microlitro

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento de grande valor nutritivo e de extrema importância para todas as etapas da vida humana, pois é fonte de proteínas, gordura, carboidratos, vitaminas e outros constituintes essenciais para o desenvolvimento e manutenção da saúde. Além disso, é uma das principais fontes de cálcio, fundamental para indivíduos na fase de crescimento, como na infância e adolescência (PEREIRA et al., 2009).

De maneira geral a adulteração do leite tem como objetivo a reduzir os elevados custos da matéria-prima e mascarar a falta de qualidade microbiológica. As fraudes normalmente praticadas em leite fluido são: adição de água, substâncias neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade, conservantes, “soro de queijo”, leiteiro, além da mistura de leite de diferentes espécies.

Para coibir com irregularidades no leite comercializado é necessária a avaliação constante da qualidade deste produto, com o objetivo de assegurar a saúde coletiva dos consumidores. Considerando a importância do leite na alimentação humana, é de suma importância à averiguação das metodologias empregadas para detecção de fraudes no leite e o aperfeiçoamento das técnicas de detecção.

Segundo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011) é obrigatório que todo leite bovino utilizado para o consumo tenha requisitos microbiológicos (contagem padrão em placas, contagem de células somáticas e pesquisas de antibióticos) e físico-químicos (índice crioscópico, extrato seco total e desengordurado, densidade, acidez titulável, alizarol e gordura) mínimos, com o objetivo de garantir a qualidade da matéria prima. Portanto, todo laticínio deve realizar estas análises independente de qual seja o produto final produzido. Em caso de alteração nos parâmetros físico-químicos normais do leite a legislação recomenda o uso de metodologias específicas para a detecção de fraude, como a pesquisa de sal, amido de milho, neutralizantes da acidez, água, cloro, formol, dentre outros.

Para o leite caprino a Instrução Normativa 37 (BRASIL, 2000) também determina que sejam realizadas AO com o objetivo de garantir requisitos mínimos para a produção de leite e derivados lácteos desta espécie. No

entanto, o leite ovino carece de normativas para sua obtenção e produção, demonstrando que existe uma lacuna na especificação da qualidade do leite e derivados lácteos desta espécie.

No Brasil, em caso de suspeita de fraude por mistura de leite de diferentes espécies, não existe nenhum regulamento para identificação deste tipo de adulteração (EGITO et al., 2006). No entanto, alguns países, principalmente os pertencentes à União Européia já possuem uma legislação própria, com a metodologia específica para detectar esta falsificação.

Na literatura existem diversos procedimentos analíticos ditos como eficazes na identificação deste tipo de fraude, como as análises cromatográficas e eletroforéticas, sendo a última considerada a mais sensível quando comparada com a primeira (VELOSO, 2001).

Observando-se a importância de se ter um controle maior do leite e dos derivados lácteos produzidos no Brasil e evitar que produtos adulterados cheguem ao mercado varejista, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar as metodologias utilizadas na verificação da qualidade do leite (bovino, caprino e ovino), identificar falhas nestas análises e verificar quais métodos são os mais adequados para identificar determinados tipos de fraude.

Para isso foram realizadas pesquisas a fim de se observar quais alterações ocorriam nas AO (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, densidade relativa a 15°C, alizarol e crioscopia) e nas DF após adição, em diferentes concentrações, de substâncias comumente utilizadas para adulterar o leite bovino (amido de milho, sal, cloro, água e neutralizantes da acidez). Também foi verificado se existiam alterações dos parâmetros físico-químicos do leite caprino e ovino após mistura de leite bovino, por meio das metodologias analíticas oficiais nacionais para leite caprino (BRASIL, 2000) e metodologias internacionais para o leite ovino (AOAC, 1980; AOAC, 1999; ISO 488, 2008), e se a técnica de eletroforese SDS-PAGE é adequada quantitativa e qualitativamente na identificação da mistura de leite bovino ao caprino e ovino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MERCADO LÁCTEO BRASILEIRO

A produção nacional de leite gira em torno de 33 bilhões de litros por ano, sendo considerado o terceiro maior produtor de leite no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e da Índia (MILKNET, 2014). Segundo o IBGE (2014), a produção de leite cru no Brasil cresceu de 7,1 bilhões de litros em 1974 para 32,1 bilhões de litros em 2011, representando um crescimento de mais de 350% (quadro 1). Este crescimento se deve ao aumento do número de vacas ordenhadas (capacidade produtiva) e do aumento da produtividade por animal (MAIA et al., 2012).

Quadro 1: Produção brasileira de leite e participação das regiões do país na produção.

Ano	Produção de leite anual (bilhões de litros)	Norte (%)	Nordeste (%)	Sudeste (%)	Sul (%)	Centro- Oeste (%)
1974	7,1	1	13	54	23	9
1980	11,2	1	14	51	23	11
1990	14,5	4	14	48	23	12
2000	19,8	5	11	43	25	16
2010	30,7	6	13	36	31	14
2011	32,1	5	13	35	32	15

Fonte: IBGE – Produção leiteira no Brasil (2014)

Projeções feitas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para os próximos 10 anos indicam que a produção de leite deverá crescer a uma taxa anual de 1,95%, correspondendo à produção de 37,8 bilhões de litros de leite cru e o crescimento do consumo (1,98% ao ano) será superior ao crescimento da população brasileira (1,17% ao ano) (IBGE, 2012).

Estudos demonstram que quanto maior o poder aquisitivo da população brasileira maior é o gasto com a alimentação, principalmente com laticínios em geral (IBGE, 2013). Segundo o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), o poder de compra do brasileiro subiu

19% entre 2003 e 2010, justificando, assim, o aumento do consumo de lácteos nos últimos anos (PINA, 2013). Para a Embrapa (2013) este fato vem aumentando as importações de lácteos no Brasil, já que a produção não está acompanhando o aumento da sua demanda (quadro 2).

Quadro 2. Importações brasileiras dos principais derivados lácteos (US\$ mil).

Produto	2008	2009	2010	2011	2012	Var. 12/11 (%)
Leite Fluido	1.764,70	4.282,70	2.989,50	9.458,00	6.705,00	- 29,10
Leite em Pó	119.169,50	147.174,40	172.921,30	335.301,70	308.141,10	13,40
Leite Condensado	-	-	-	-	-	-
Creme de Leite	96,20	182,60	40,70	4,00	0,80	- 56,10
logurte	-	-	-	-	0,20	-
Leitelho	777,00	2.878,20	973,40	938,10	4.287,90	357,10
Soro de leite	43.068,80	25.681,30	36.475,40	40.118,60	46.783,20	16,60
Manteiga	3.783,10	13.633,60	4.976,80	4.616,10	18.624,00	303,50
Demais gorduras lácteas	177,50	2.399,60	2.139,00	368,30	9.458,30	2.468,20
Queijos	29.518,10	60.094,90	103.309,20	205.314,40	150.307,90	- 26,80
Doce de leite	1.287,30	1.244,10	1.791,30	2.188,20	1.718,20	- 21,50
Leite modificado	264,20	1.655,50	1.535,60	2.023,70	3.178,00	57,00
Outros produtos lácteos	13.238,90	5.616,10	3.153,20	8.786,00	11.585,20	31,90
TOTAL	213.145,20	264.843,00	330.305,40	609.117,00	632.790,80	3,90

Fonte: Embrapa – Conjuntura do Mercado Lácteo (2013).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o Brasil ocupa atualmente a 65ª posição no consumo mundial de produtos lácteos (SOUAGRO, 2012). Esta posição ainda está bem aquém se comparados com outros países, como a Austrália, Áustria, China, Alemanha, França, Itália, Suíça e Estados Unidos (SWISS MILK, 2013), no entanto, o consumo de produtos lácteos aumentou nos últimos 10 anos passando de 120 para 170 litros de leite por habitante ao ano (AQUINO, 2013). Apesar do aumento no consumo de leite na última década, este ainda está abaixo do recomendado pela ONU, que é de 200 a 220 litros de leite por ano (AQUINO, 2013).

Um produto com destaque em todo mundo é o leite de cabra, que vem conquistando um importante lugar no mercado lácteo. A população de caprinos vem crescendo no Brasil, atingindo 900 milhões de cabeças em 2010, fato que proporcionou uma marca de produção leiteira de 17.374.310 milhões de litros (FAO, 2012), colocando o país em 20º lugar no ranking mundial de produção de leite de cabra, sendo superado por países como Índia (1º), França (5º), Espanha (6º) e Grécia (8º). Porém, possivelmente, a produção de leite de cabra

é muito maior do que as estatísticas oficiais relatam, em virtude da grande quantidade de consumo doméstico não declarado (HAENLEIN, 2001).

Derivados lácteos caprinos vêm conquistando o mercado, sendo principalmente consumidos como leite de cabra integral pasteurizado e ou congelado, queijo frescal, queijo Boursin natural ou com especiarias (alho, cebola, ervas etc.), queijo de massa semi-dura como o Moleson, queijo de massa semi mole como Chevrotin, Chabichou, Crotin, Saint Maure, Piramide, sorvetes, cosméticos, leite em pó, leite esterilizado e leite UAT (CORDEIRO, CORDEIRO, 2013).

O leite ovino, apesar do número de produção e consumo menos expressivo, também é uma importante matéria prima para produtos lácteos nacionais e internacionais. Em escala mundial, o leite de ovelhas corresponde a cerca de 1,3% da produção de leite das principais espécies produtoras (ROHENKOHL et al., 2011). Estima-se que a produção de leite ovino no Brasil é de aproximadamente 509 mil litros por ano, correspondendo 0,0019% do total de leite produzido (ROHENKOHL et al., 2011).

O principal derivado lácteo ovino é o queijo, considerado ideal para essa finalidade, devido a sua maior percentagem de conteúdo sólido. Como seus principais representantes estão o Roquefort, Pecorino, Feta e Romano. Além dos queijos outros produtos podem ser feitos a partir desta matéria prima, como por exemplo o iogurte e o sorvete (ROHENKOHL et al, 2011).

## 2.2 PRINCIPAIS DEFERENÇAS ENTRE O LEITE BOVINO, CAPRINO E OVINO

Qualquer mamífero tem a capacidade de produzir leite. Entretanto, as espécies mais consumidas em todo o mundo são a bovina, com 84% de toda a produção mundial, seguida pela caprina (2%), ovina (1%) e outras espécies, como a de búfala, asna, égua, burra, rena, ianque, llama, alpaca, zebra e camela, que juntos representam 13% da produção mundial (FAO, 2012).

O leite é composto basicamente por água, gordura, proteínas e carboidratos, além de pequenas quantidades de substâncias minerais, substâncias hidrossolúveis, 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).

A composição físico-química normalmente varia entre as espécies em relação ao percentual dos seus componentes. A composição do leite bovino, caprino e ovino pode ser observada no quadro 3 abaixo:

Quadro 3: Composição centesimal do leite bovino, caprino e ovino.

Características	Tipos de leite		
	Leite Bovino	Leite Caprino	Leite Ovino
EST (%)	12,59	12,71	17,87
Gordura (%)	3,57	3,89	5,88
Proteína (%)	3,27	3,23	4,38
Lactose (%)	5,18	4,2	4,85
Acidez em Ácido Láctico (%)	0,18	0,18	0,15
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1.033,74	1.030,20	-
Cinzas (%)	0,53	0,69	0,85

Fonte: FAO, 2012

### 2.2.1 Leite bovino

Segundo a Instrução Normativa 68 (BRASIL, 2006) o leite bovino deve ter aspecto líquido opaco, cor branca ou levemente amarelada, odor e sabor característicos.

Sua gordura é constituída por cerca de 99,5% de compostos lipídicos e 0,5% de compostos lipossolúveis. Os primeiros se dividem em lipídeos simples, lipídeos complexos e ácidos graxos livres, enquanto os segundos são constituídos por colesterol, vários hidrocarbonetos, o grupo das vitaminas lipossolúveis e alguns alcoóis (VALSECHI, 2012).

O leite bovino contém vários compostos nitrogenados, onde aproximadamente 95% são proteínas (SILVA, 1997). As proteínas do leite bovino são formadas basicamente de caseínas (cerca de 80%), dispersas na forma de micelas que se mantêm em suspensão coloidal, e proteínas do soro (20%), solúveis na fase aquosa do leite (BEUX, 2012).

A caseína é formada pela mistura das fosfoproteínas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína, sendo a  $\alpha_1$  a principal porção protéica responsável por causar reações alérgicas ao leite bovino (CLARCK; SHERBON, 2000). As proteínas do soro são formadas por  $\beta$  lactoglobulina,  $\alpha$  lactoalbumina, soroalbumina e imunoglobulinas (ORDÓÑEZ, 2005). São consideradas termossensíveis, pois sofrem desnaturação mesmo em pequenas oscilações de temperaturas (MACHADO, 2010).

De acordo com a Embrapa (2012) os principais derivados lácteos bovinos são queijos, leite em pó, iogurte, leite condensado, leite fermentado e manteiga (quadro 4).

Quadro 4: Aquisição per capita de derivados lácteos, em equivalente litros de leite.

Produtos	Total (L de leite)
Creme de leite	0,38
Leite condensado	1,53
Leite bovino fresco	9,79
Leite bovino pasteurizado	25,64
Leite em pó desengordurado	0,99
Leite em pó integral	6,56
Outros	8,93
Queijo minas	4,44
Queijo mussarela	6,53
Queijo parmesão	0,81
Queijo prato	3,32
Outros queijos	1,86
Requeijão	1,23
Iogurte	1,78
Leite fermentado	0,72
Manteiga	0,45
Outros	0,49

Fonte: CILeite/Embrapa Gado de Leite, 2012

### 2.2.2 Leite caprino

Segundo a Instrução Normativa 37 (BRASIL, 2000), o leite caprino é o produto de oriundo da ordenha completa, ininterrupta em condições de higiene, de animais da espécie caprina, bem alimentados e descansados.

Assim como o leite bovino esta espécie apresenta vários compostos nitrogenados, onde aproximadamente 95% são proteínas. A caseína desta espécie não possui ou possui em quantidades muito reduzidas a fração  $\alpha_1$ , fato que comprova a menor alergenicidade deste leite e dos seus derivados se comparados ao de vaca (CLARCK, SHERBON, 2000).

Observando a porção lipídica, o leite caprino possui uma maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média se comparados ao leite bovino e ovino, como as ácidos capríco (C6:0), caprílico (C8:0) e cáprico (C10:0), que dão o sabor e aroma típico a este produto. Devido ao seu pequeno tamanho podem ser absorvidos diretamente sem necessidade de uma reesterificação. Desta forma são facilmente hidrolisados por enzimas pancreáticas (HAENLEIN, 2001), facilitando a digestão, o esvaziamento gástrico e, conseqüentemente, reduzindo o aparecimento de refluxo gastroesofágico (FISBERG, 1999; SILVA, 2009).

Por este motivo são utilizados como fonte de energia para bebês prematuros, pacientes com anorexia, desnutrição ou doenças relacionadas à má absorção lipídica, diarreia, esteatorreia, hiperlipoproteinemia, ressecções intestinais, fibrose cística, desnutrição infantil, cálculo biliar, insuficiência pancreática, pancreatectomia, déficit ou ausência de sais biliares como em hepatite crônica ou neonatal, cirrose biliar ou alcoólica e icterícia obstrutiva (SILVA, 2009).

Os principais derivados lácteos do leite caprino são os queijos e iogurtes. Sua demanda tem sido crescente em função do aumento da renda da população, que passou a consumir derivados lácteos desta espécie, principalmente para a culinária internacional e do aumento do número de consumidores com restrições fisiológicas, principalmente os alérgicos a proteína bovina e os portadores de desordens gastrointestinais (SILVA, 2009).

Nas últimas décadas tem-se observado, ainda, um interesse crescente relacionado à busca de alimentos que possuem componentes benéficos à

fisiologia humana, os chamados alimentos funcionais (PRATES; MATEUS, 2002; AGUIAR et al., 2005). Nesse sentido, a procura por leite caprino e seus derivados aumentou, uma vez que estes produtos já estão consolidados pelo aspecto nutricional e atualmente considerados como possível alternativa para atender a nova tendência de consumo por alimentos funcionais (CHANDAN, 1992).

### **2.2.3 Leite ovino**

Segundo Martins (2000), o leite ovino se distingue dos outros tipos de leite, principalmente pelo aspecto: sua cor é mais branca, é mais opaco e tem uma viscosidade mais elevada. Além disso, este leite tem uma maior resistência à proliferação bacteriana nas primeiras horas após a ordenha, devido a sua atividade imunológica própria e pelo seu poder tampão (GUERRA, 2007).

O leite de ovelha possui um percentual muito maior de lipídios, se comparado ao leite bovino, no entanto sua digestibilidade é maior, uma vez que possui mais de ácidos graxos de cadeia curta e média, além de possuir uma maior quantidade de pequenos glóbulos de gordura (RAYNAL-LJUTOVAC, et al., 2008).

Para Penna (2011), o leite desta espécie possui 40% a mais de proteína que o leite bovino e caprino, justificando assim, o seu alto rendimento e a sua importância como matéria prima para derivados lácteos, principalmente queijos. Além disso, sua proteína é mais sensível ao coalho, fazendo com que se coagule mais rapidamente e produzindo um coágulo mais firme, fato que também favorece o seu rendimento, que pode alcançar de 18 a 25%. Ou seja, são necessários apenas 4 a 5 litros do leite de ovelha para a produção de 1kg de queijo (PENNA, 2011), enquanto ao utilizar o leite bovino para a mesma quantidade de queijo, necessita-se, em média, 10 litros de leite. Dentre os queijos ovinos de maior destaque estão: o Queijo Roquefort, o Queijo Pecorino Romano e o Queijo Azeitão (RIBEIRO, 2005).

## 2.3 FRAUDES EM LEITE

Segundo o RIISPOA (BRASIL, 2008), fraude no leite é a adição ou retirada parcial ou total de qualquer substância ou composto natural do leite. Esta prática prejudica os consumidores, produtores rurais e concorrentes da empresa fraudadora (ROBIM, 2011).

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; MIMOSO, 2000; MARTINS, 2010; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2010).

As fraudes de natureza econômica mais comumente praticadas no Brasil ao leite fluido bovino são: adição de água, soro e leiteiro, com o objetivo de aumentar o volume de leite; substâncias reconstituintes, como amido de milho e sal, com o objetivo de recompor a aparência e algumas características do leite fraudado com água ou soro de queijo; conservantes, como cloro e formol, para evitar o crescimento excessivo de microrganismos contaminantes do leite e neutralizantes da acidez, como o bicarbonato de sódio, que diminuem o pH ácido causado pelo excesso de microrganismos contaminantes (DIAS et al., 2009; AQUINO, 2013). Para o leite caprino e ovino as principais adulterações são: adição de água, com o objetivo de aumentar o volume da matéria prima e a mistura com leite bovino, com o objetivo de diluir o leite com o produto de uma espécie de valor agregado inferior, proporcionando o aumento do seu volume (VELOSO, et al., 2002).

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).

Tendo em vista que a qualidade dos produtos de origem animal tem se tornado uma preocupação mundial, a detecção de produtos rotulados de forma fraudulenta e de qualidade inferior é cada vez mais importante, tanto por

razões econômicas, como por razões de saúde pública. Por isso, é necessária a utilização de metodologias eficazes e sensíveis para detectar a possível presença de substâncias indesejáveis nos alimentos (EGITO et al., 2006).

Vale destacar que nem todo o produto fabricado com a mistura de leite de mais de uma espécie é considerado fraude. Atualmente existem muitas pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos produtos com o uso de leites de diferentes espécies, como, por exemplo, iogurtes (BEZERRA; CORREIA, 2012) e queijos (PIGNATA et al., 2013). Tal prática é considerada aceitável desde que descrita às devidas proporções de cada espécie no rótulo do produto final (DIAS et al., 2012).

## 2.4 METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FRAUDE

Diversas metodologias analíticas vêm sendo utilizadas na detecção de fraudes em leite fluido, no entanto existe uma necessidade de aperfeiçoamento destas técnicas e de determinação de limites de detecção para cada metodologia (FUENTE; JUARÉZ, 2005). A maior dificuldade encontrada pela Inspeção Federal (SIF) ligada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é atualizar as técnicas de detecção de fraudes tão rapidamente quanto o surgimento de diferentes tipos de adulterações (AQUINO, 2013).

### 2.4.1 Análises oficiais

As análises oficiais do leite consistem em provas sensoriais, provas de rotina e provas de precisão. A primeira é a observação de alterações nas características normais do leite, como cor, cheiro, sabor e aspecto do leite. As análises de rotina consistem na densidade, acidez titulável, alizarol, gordura e extrato seco total e desengordurado. Já as análises de precisão são o índice de refração no soro cúprico e a determinação do índice crioscópico (BRASIL, 2008).

No Brasil, a análise oficial tem como objetivo observar alterações no leite causadas por fraude ou má qualidade microbiológica. São consideradas não muito precisas e, por isso, só poderá ser afirmado anormal e condenado, o

leite que se apresente fora do padrão em no mínimo 3 (três) provas de rotina ou em 1 (uma) de rotina e 1 (uma) de precisão (BRASIL, 2008).

Em casos de suspeitas de fraude por adição de substâncias estranhas à composição normal do leite recomenda-se uma investigação mais apurada da fraude, por meio de metodologias específicas para cada tipo de fraude.

#### **2.4.2 Identificação de fraude em leite bovino**

As metodologias específicas para detecção de fraude têm como objetivo determinar qualitativamente uma determinada fraude. São técnicas simples, rápidas, práticas e fáceis de realizar, não necessitando de mão-de-obra qualificada para serem feitas. As principais análises realizadas pelos laticínios são: identificação de neutralizantes da acidez, cloro, formol, sal e amido de milho (WANDERLEY, et al., 2013).

A identificação de neutralizantes da acidez tem como objetivo verificar se alguma substância neutralizante, como o bicarbonato de sódio, foi adicionada ao leite, com a intenção de mascarar a acidez desenvolvida por presença excessiva de microrganismos mesofílicos causados pela péssima qualidade do leite ou do seu armazenamento. Wanderley e colaboradores (2013), estudando a qualidade do leite comercializados no estado do Rio de Janeiro, detectaram a adição de substâncias alcalinas como o segundo maior agente de fraude.

O cloro e o formol são substâncias adicionadas com o objetivo de conservar o leite de péssima qualidade microbiológica, impedindo o crescimento exagerado de microrganismos que, conseqüentemente, levariam a uma acidificação excessiva do produto (TRONCO, 2003).

Já o sal e o amido de milho mascaram a fraude por água ou soro, recompondo, em parte, a sua aparência. Esta adulteração é realizada devido à facilidade de detecção de fraude por aguagem pelos métodos de rotina e precisão (WANDERLEY et al., 2013).

A adição de água ou soro tem como finalidade aumentar o volume do leite. Segundo a literatura, a água é a principal agente fraudadora do país (CRUZ; SANTOS, 2008; SILVA et al., 2008). Na maioria das vezes, ocasiona alteração nas provas de álcool/alizarol e de acidez titulável devido à diluição

das substâncias ácidas presentes normalmente no leite, aumenta o ponto de congelamento ( $> -0,530^{\circ}\text{H}$ ), diminui a densidade ( $< 1,028$ ) e o ESD ( $< 8,4\%$ ). Em alguns casos, mesmo sendo detectada aguagem pelo crioscópio eletrônico a densidade, o ESD e a acidez titulável apresentavam-se dentro dos parâmetros de normalidade (WANDERLEY, 2013).

### **2.4.3 Identificação de fraude por mistura de leites de diferentes espécies**

Além das análises oficiais que são amplamente utilizadas nas indústrias, outras análises se mostram úteis para a identificação de fraudes mais elaboradas, como a mistura de leite.

Ainda não existe um consenso entre os autores sobre o método mais adequado para este tipo de fraude. Ramos e Juarez (1984) dividiram as metodologias analíticas para a identificação da mistura de leite de diferentes espécies em dois grupos, um baseado na determinação da composição da gordura e outro na composição da proteína.

Para composição da gordura são utilizados, geralmente, os índices de ácidos graxos voláteis solúveis e insolúveis, em particular o índice de Polenske e métodos cromatográficos (VELOSO et al., 2002). Para a determinação da composição protéica existem as técnicas cromatográficas, imunológicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese (EGITO et al., 2006).

#### *2.4.3.1 Eletroforese*

Segundo Rocha e colaboradores (2013), a eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração das moléculas carregadas, numa solução, em função da aplicação de um campo elétrico. Ela 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 a fim de utilizá-las em outras aplicações (SCHRÖDER et al., 2008).

Esta técnica é amplamente utilizada para separar proteínas nativas e desnaturadas (KAISER; KRAUSE, 1985). Em alguns países, ela tem sido utilizada para detectar a adulteração por mistura de leite de diferentes



espécies, prática fraudulenta comumente realizada (PINTO, 1991; ROSAS, 1997; MONTÁNEZ et al, 2000).

#### 2.4.3.1.1 Eletroforese SDS-Page

A Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida (SDS-Page) é um método simples e barato muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas (STEPHAN, 2006; XIONG et al., 2006; ANEMA, 2009). É formada por um gel de acrilamida com ligações cruzadas de N-metil-bis-acrilamida, cuja porosidade da malha pode ser escolhida de acordo com o tamanho da proteína a ser separada (ROCHA, 2013).

As proteínas migram em resposta a um campo elétrico através dos poros do gel. O tamanho destes 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).

Inicialmente a amostra passa por um processo de extração e precipitação, onde as proteínas serão separadas da matriz alimentar. Em seguida são solubilizadas, processo pelo qual há quebra das interações macromoleculares da proteína (ROCHA, 2013).

É adicionada à proteína recém extraída o SDS, um detergente anfipático, cujo objetivo é desnaturar as proteínas, tornando-as lineares e conferindo carga uniforme. Esse fato é importante para que a separação das proteínas seja apenas causada pela sua massa molecular e não pela sua carga ou forma (ROCHA, 2013).

Após o tratamento com o SDS alíquotas da amostra são aplicadas no topo do gel de poliacrilamida e submetidas a uma corrente elétrica, fazendo com que as proteínas migrem para o polo positivo. Dependendo da massa molecular, cada proteína se moverá diferentemente: as menores migrarão mais rapidamente, enquanto as maiores terão maior dificuldade em atravessar a malha do gel, demorando mais para atingirem o polo inferior (ROCHA, 2013).

Por fim, o gel é corado e submetido à fotodocumentação. A quantidade de proteína presente em cada banda é, então, identificada por um software específico.

### 3 DESENVOLVIMENTO

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

#### 3.1 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA VERIFICAR FRAUDE EM LEITE FLUIDO

##### RESUMO

**WANDERLEY, C. H.; SILVA, A. C. de O.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T. M.; CONTE JUNIOR, C. A. Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido.** No presente estudo foi avaliado o comportamento dos métodos analíticos oficiais de rotina (AO) (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, densidade relativa a 15°C e crioscopia) e de detecção de fraudes (DF) utilizadas para leite fluido. Para a determinação da sensibilidade das análises (AO e DF), amostras de leite foram experimentalmente adulteradas com diversas concentrações de amido de milho (0,25 a 1%), NaCl (0,05 a 1%), substâncias alcalinas (0,05 a 1%), cloro (0,3 a 1%) e água (0,3 a 5%). Foram observadas alterações dos padrões físico-químicos pelos AO nas fraudes contendo 0,4% de água, 0,06% de cloretos, 0,06% de neutralizantes da acidez e 0,4% de cloro, não sendo possível detectar alteração no leite fraudado com 0,06% de amido de milho. Na determinação de substâncias adicionadas ao leite (DF), os níveis mínimos de detecção encontrados foram de 0,06% de NaCl, 0,4% de cloro, 0,25% de amido de milho, 0,06% de neutralizantes da acidez e 0,4% de água. Além disso, foi avaliada a presença desses tipos de fraudes no leite fluido (pasteurizado e UAT) comercializado no estado do Rio de Janeiro. No mercado varejista, foram obtidas 135 amostras de 30 marcas de leite UAT e 15 marcas de leite pasteurizado, das quais, 83,3% (25) das marcas do leite UAT e apenas 6,66% (1) do leite pasteurizado obtiveram valores compatíveis com a qualidade preconizada considerando os limites propostos pela legislação.

Palavras-chave: leite; fraudes; análises físico-químicas.

## ABSTRACT

**WANDERLEY, C. H.; SILVA, A. C. de O.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T. M.; CONTE JUNIOR, C. A. Evaluation of the sensitivity of analytical methods for identifying fraud in fluid milk.** In this work it was evaluated the behavior of official routine analytical methods (lipid/fat, nonfat dry, titratable acidity, relative density at 15 ° C and freezing point) and fraud detection generally used for fluid milk. To determine the sensitivity of the analysis, milk samples were experimentally tampered with various concentrations of corn starch (0.25 1%), NaCl (0.05 to 1%), alkalis (0.05 1%), chlorine (0.3 to 1%) and water (0.35%). There were alterations observed in the physicochemical patterns composition of the fraudulent samples containing 0.4% of water, 0.06% of chloride, 0.06% of acidity neutralizing and 0.4% of chlorine. Official analytical procedures were unable to detect changes in adulterated milk with 0.06% of corn starch. In order to determine the substances added to the milk, the detection levels found using official methods were: 0.06% of NaCl, 0.4% of chlorine, 0.25% of starch, 0.06% of acidity neutralizing and 0.4% of water. Furthermore, it was also verified the quality of fluid milk (pasteurized and Ultra High Temperature) sold in the state of Rio de Janeiro. One hundred and thirty-five samples of thirty brands of UHT milk and fifteen samples of pasteurized milk were obtained and it was observed that 83.3% (25) samples of UHT milk and 6.66% (1) of pasteurized milk showed compatible values with the quality recommended and considering the limits proposed by the legislation.

Key words: milk; fraud; physicochemical analyses.

## INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro alimento dos mamíferos no período inicial da vida e as substâncias contidas nessa matriz alimentar fornecem energia e nutrientes necessários para o crescimento (PRATA & PRATA, 2012). Esse alimento apresenta proteínas de alto valor biológico e vitaminas essenciais ao desenvolvimento, contém no mínimo vinte substâncias solúveis em água e quatro vitaminas lipossolúveis, sendo a principal fonte de cálcio entre os

alimentos, além de fornecer energia pela presença de lipídios e de lactose (LEMAY; RIJNKELS; GERMAN, 2009).

A composição do leite é complexa e suas características variam conforme a espécie animal. O maior constituinte é a água e de acordo com a espécie ocorrem variações nas quantidades de lipídios, proteínas e carboidratos, os quais são sintetizados na glândula mamária. Pequenas quantidades de minerais e outros constituintes solúveis são provenientes diretamente do plasma sanguíneo (PELLEGRINI et al., 2012).

Pasteurizado e ultra alta temperatura (UAT) são as principais formas de consumo de leite fluido no Brasil (BASTOS et al., 2011; SOARES et al., 2010). Entre os fatores que interferem na qualidade desses produtos, a adição de substâncias estranhas ou fraudulentas apresenta relevância comercial e nutritiva. As fraudes de natureza econômica mais comumente praticadas no leite fluido são adição de água, adição de substâncias neutralizantes da acidez, reconstituintes da densidade e adição de soro de leite (FILHO et al., 2009). Substâncias reconstituintes da densidade são frequentemente adicionadas 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 (FILHO et al., 2009). Atualmente, os fraudadores também têm adicionado açúcar e maltodextrina, dosada de forma a restaurar valores analíticos “normais” para certos índices de qualidade física ou química do leite normal (FERRÃO et al., 2007).

As substâncias neutralizantes são adicionadas com objetivo de mascarar a acidez desenvolvida por microrganismos mesofílicos, que desdobram a lactose em ácido láctico e ocasionam a coagulação do leite. A neutralização ilegal da acidez mascara, dessa forma, a qualidade dessa matriz. No caso da adição de conservantes, normalmente são utilizadas substâncias químicas ou outros agentes, os quais exercem ação sobre o desenvolvimento de microrganismos, por retardar a multiplicação. Os conservantes mais utilizados são ácido bórico e seus sais, ácido salicílico e seus sais, água oxigenada, bicromato de potássio, formol, cloro e hipocloritos (TRONCO, 2008).

De acordo com a IN 62 (BRASIL, 2011), não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia na elaboração do leite pasteurizado. Para o leite UAT, o regulamento técnico (BRASIL, 2002) especifica que as únicas substâncias que podem ser adicionadas durante o preparo e utilizadas como adjuvantes de tecnologia são o citrato de sódio, mono, di ou trifosfato de sódio, separados ou em combinação e em quantidade que não seja superior a 0,1g/100 ml.

No Brasil, em outubro de 2007, após denúncias, a Polícia Federal deflagrou a Operação Ouro Branco, onde os envolvidos foram acusados de adicionar ao leite longa vida integral, substâncias não permitidas ou que excediam a dosagem máxima permitida por lei tornando-o impróprio para consumo, segundo laudo emitido por laboratório vinculado ao Ministério da Agricultura (OCBES, 2010).

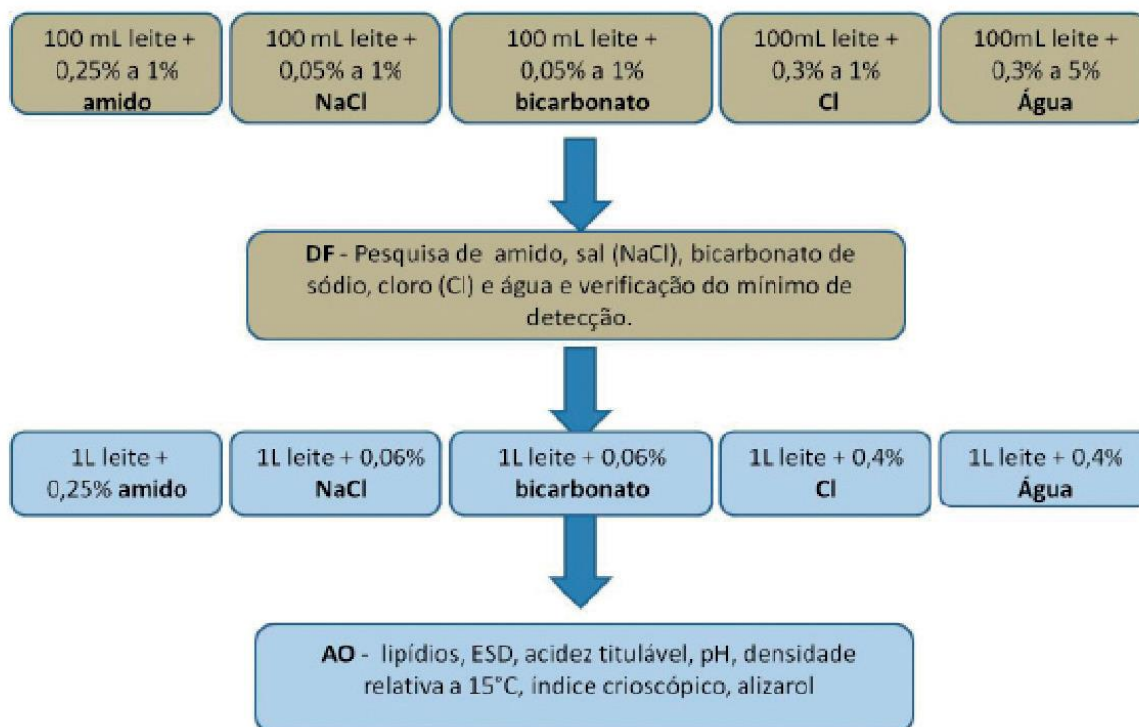
Para coibir irregularidades no leite comercializado é necessária a constante avaliação da qualidade desse produto visando a assegurar a saúde coletiva e a evitar a perda econômica. Considerando a relevância do leite na alimentação humana, é de suma importância a avaliação das metodologias empregadas para detecção de fraudes e o aperfeiçoamento dessas técnicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram adquiridas no mercado varejista do estado do Rio de Janeiro, em um período de seis meses, 135 amostras de leite, sendo 15 marcas de leite pasteurizado e 30 de leite UAT. Em seguida, as amostras foram encaminhadas aos laboratórios para os procedimentos analíticos.

Para verificar a qualidade das marcas comerciais de leite fluido (pasteurizado e UAT) foram realizadas análises oficiais de rotina (AO) (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, pH, densidade relativa a 15°C, ponto de congelamento e álcool/alizarol) e detecção de algumas fraudes específicas (DF) (cloro e hipocloritos, amido, cloretos e neutralizantes da acidez) segundo protocolo analítico descrito nos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos (Brasil, 2006).

Para avaliar a sensibilidade dos procedimentos analíticos oficiais (AO e DF) foram simuladas as principais adulterações ocorridas no leite com a adição de diferentes percentuais de água, amido, sal (NaCl), bicarbonato de sódio e cloro (Cl), conforme figura 1:



**Figura 1** – Desenho experimental dos procedimentos analíticos realizados no leite experimentalmente adulterado com água, bicarbonato, NaCl, cloro e água, antes e após a verificação do limite de detecção

Foram adicionados, separadamente, em 100 ml de leite, 0,3 a 5% de água (H<sub>2</sub>O), 0,25% a 1% amido de milho (AM); 0,05% a 1% de NaCl (Sal), 0,05% a 1% de bicarbonato de sódio (BS) e 0,3% a 1% de cloro (Cl).

Depois de verificado o nível mínimo de detecção para cada substância adicionada ao leite, 1 litro de leite foi experimentalmente fraudado com essa concentração mínima, sendo obtidos 5 grupos experimentais: (0,4% H<sub>2</sub>O – adição de água; 0,25% AM - adição de amido; 0,06% Sal - adição de sal; 0,06% BS – adição de bicarbonato de sódio e 0,4% Cl- adição de cloro), sendo realizados os procedimentos analíticos oficiais (AO) para o leite fluido (lipídios, ESD, acidez titulável, pH, densidade relativa a 15°C, índice crioscópico,

alizarol) com a finalidade de verificar se havia alguma alteração detectável pelos métodos convencionais de rotina.

Foram realizadas seis repetições por procedimento analítico e para cada tipo de substância adicionada ao leite. Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA two-way) e posterior diferença de média pelo teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5 (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Verificação da sensibilidade dos métodos analíticos**

Após a adição experimental de substâncias ao leite e a execução dos procedimentos analíticos (DF) para verificar a sensibilidade dessas metodologias, foi possível inferir os seguintes limites de detecção: 0,06% de NaCl; 0,4% de cloro; 0,25% de amido, 0,06% de neutralizantes da acidez e 0,4% de água. Pelos resultados observados, as análises de determinação de cloreto de sódio e neutralizantes da acidez foram as mais sensíveis, detectando baixos níveis dessas substâncias. Não existem dados na literatura referentes a essas análises em relação ao limite mínimo de detecção. Os parâmetros físico-químicos que sofreram alguma alteração podem ser visualizados na tabela 1.

	FRAUDES EXPERIMENTAIS				
Análises Oficiais	0,06% NaCl	0,4% Cloro	0,25% Amido	0,06% BS*	0,4% Água
Gordura	N	N	N* - coloração	N	N
Acidez	N	N	N	N	N
Densidade	N	N	N	N	N
Crioscopia	0,555°H±0,002 (-0,551°H/- 0,559°H)	0,553°H±0,004 (-0,551°H/- 0,562°H)	N	0,583°H±0,02 (-0,559°H/- 0,612°H)	0,527°H±0,001 (-0,526°H/-0,528°H)
SNG	N	N	N	N	N
Proteína Total	N	N	N	N	N
Alizarol 72 %	N	N	N	N	N

Tabela 1 – Alterações observadas pelas análises oficiais após a adição de concentrações mínimas de sal, cloro, amido, neutralizantes da acidez (bicarbonato de sódio) e água

\*BS= bicarbonato de sódio; SNG = sólidos não gordurosos; N= valores normais

As amostras nas quais foram adicionadas 0,4% de água apresentaram alteração no índice crioscópico ( $-0,527^{\circ}\text{H}\pm 0,001$ ) e diminuição da densidade ( $1,029\pm 0,02$ ) quando comparadas com a amostra controle ( $-0,542\pm 0,03$  e  $1,032\pm 0,04$ , respectivamente). Entretanto, a densidade permaneceu dentro dos limites estipulados pela legislação (1,028 a 1,034) (BRASIL, 2011), sugerindo que a diluição dos componentes do leite pela fraude com 0,4% de água é confirmada pelo ponto de congelamento.

A adição de 0,25% de amido não acarretou alteração em nenhum dos parâmetros normais do leite, demonstrando que, nesta concentração, não é possível a detecção de fraude pelas metodologias oficiais (AO). Uma avaliação sensorial observada nessas amostras e que sugere estudos mais profundos refere-se à coloração da porção lipídica após determinação pelo método butirométrico, que se apresentou mais esbranquiçada e opaca diferindo da tonalidade observada na amostra-controle, na qual se apresentou amarelada e translúcida. Esse fato pode estar relacionado à reação das moléculas de glicose geradas pela hidrólise do amido com o aquecimento e da reação com o ácido.



A adição de 0,06% de NaCl acarretou alteração apenas do índice crioscópico, afastando o ponto de congelamento de 0° Celsius ( $-0,555^{\circ}\text{H}\pm 0,002$ ).

Nas amostras adulteradas com 0,06% de bicarbonato de sódio observou-se diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) no ponto de congelamento do leite ( $-0,583^{\circ}\text{H}\pm 0,02$ ) e ligeira diminuição da acidez titulável, que permaneceu dentro do permitido pela Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), assim como os demais parâmetros.

A adição de 0,4% de cloro ao leite ocasionou a diminuição do ponto de congelamento ( $0,553^{\circ}\text{H}\pm 0,004$ ); no entanto, os demais parâmetros permaneceram normais.

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que a determinação do ponto de congelamento demonstrou ser o procedimento efetivo para constatar possíveis fraudes, seguido de alterações subjetivas nas provas do alizarol.

Cruz e Santos (2008) demonstraram que ao avaliar a densidade é possível identificar a adulteração do leite acima de 10% de sua substituição por água, a de gordura acima de 12%, o EST acima de 8% e o ESD acima de 4%, evidenciando que o procedimento mais adequado deverá ser uma combinação dessas análises.

No presente estudo, observou-se que verificada a acidez titulável entre 14 e 19°D, a prova do alizarol apresentava coloração róseo-salmão, característico de normalidade e abaixo de 14°D, violáceo. Esses dados diferem daqueles descritos por Castro (2005), que observou coloração vermelho-lilás com acidez entre 16°D e 18°D e violeta quando a acidez apresentava valores inferiores a 16°D. Essa divergência pode demonstrar tanto a subjetividade da prova do alizarol, como a subjetividade da percepção da cor.

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2008), o leite só poderá ser condenado caso haja alterações em uma (1) prova de rotina e em uma (1) de precisão ou em pelo menos três (3) análises de rotina. Além disso, ainda segundo esse regulamento, não poderá haver a presença de nenhuma substância que não faça parte de sua composição normal.

Baseando-se nessa legislação, nas condições deste estudo, o leite adulterado nas concentrações mínimas de detecção seria liberado para processamento e consumo, fato que demonstra a relevância do procedimento de crioscopia (ponto de congelamento).

Outro fator a ser avaliado é o percentual de indústrias de laticínios no Brasil que fazem a pesquisa de conservantes e adulterantes no leite. Segundo Dahmer (2006), nesses estabelecimentos localizados no estado do Mato Grosso do Sul, 82,6% e 8,7% das indústrias com Serviço de Inspeção Federal (SIF) realizam pesquisa de conservantes e adulterantes, respectivamente; naquelas com Inspeção Estadual (SIE), 34,9% possuem laboratório de análises físico-químicas e realizam análises básicas de densidade, acidez e alizarol e apenas 6,6% pesquisam a presença de conservantes no leite.

### Pesquisa de fraudes do leite comercializado

As médias e o desvio-padrão encontrados nas análises físico-químicas oficiais do leite pasteurizado e UAT adquiridos no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro podem ser visualizados na tabela 1.

Análises Oficiais (Brasil, 2006)	Leite pasteurizado	Leite UAT
Gordura (g/100 g)	3,11±0,0011 3,0-3,3	3,25±0,002 3,0-3,63
Acidez em g de ácido láctico/100 ml	14,0±2,75 10-18°D	17,4±0,74 16-18°D
Densidade relativa, 15/15°C, g/ml	1,026±0,0041 1,0268-1,032	1,031±0,0019 1,028-1,034
Índice crioscópico	-0,5276°H±0,019 -0,505-0,576°H	-0,518°H±0,070 -0,515-0,605°H
Sólidos não-gordurosos (g/100g)	8,02±0,59 6,99-8,60	8,64±0,44 8,30/9,59
Proteína total (g/100 g)	3,028±0,09 2,90-3,14	3,04±0,25 3,49-2,78
Estabilidade ao alizarol 72 % (v/v)	Alcalinidade (80%) – Estável (100%)	Normal (100%) - Estável (100%)
Substâncias alcalinas	Positivo (53,3%)	Negativo

Tabela 1 - Resultados das médias e desvio-padrão das amostras de leite pasteurizado e UAT adquiridas no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro no período de 6 meses

Considerando as marcas de leite UAT adquiridas no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro, 83,3% (25/30) apresentaram resultados analíticos compatíveis com os preconizados pela legislação em vigor (BRASIL, 2002).

Apenas cinco (16,6%) marcas apresentaram irregularidades, sendo duas (6,6%) por aguagem, com valores do ponto de congelamento acima do permitido pela legislação (superior a  $-0,530^{\circ}\text{H}$ ), duas (6,6%) por adição de substâncias alcalinas e uma (3,3%) amostra com diminuição acentuada do ponto de congelamento (inferior a  $-0,550^{\circ}\text{H}$ ), sugerindo a adição de alguma substância reconstituente ou álcool.

Em contrapartida, 93,3% (14/15) das amostras de leite pasteurizado apresentaram alguma irregularidade relacionada à qualidade e/ou a fraudes, caracterizando um perfil de qualidade indesejável deste tipo de leite. As irregularidades no leite pasteurizado encontradas foram: diminuição na acidez titulável (53,3%), aumento do índice crioscópico (86,6%), diminuição do índice crioscópico (0,3%), alcalinidade na prova do alizarol (80%), presença de substâncias alcalinizantes (53,3%), diminuição do extrato seco desengordurado (40%) e diminuição da densidade (80%).

Em nenhuma das amostras foi verificada a presença de cloretos e de cloro, alterações no teor de gordura ou instabilidade proteica.

A fraude mais frequentemente observada foi a adição de água ou de outra substância que ocasionou a diminuição dos sólidos totais, corroborando os dados relatados por vários autores (BORGES; PINTO, 2007; CRUZ; SANTOS, 2008; PINA et al., 2007; SILVA et al., 2008). Esse tipo de fraude, na maioria das vezes, ocasiona alteração nas provas de álcool/alizarol e de acidez titulável devido, provavelmente, à diluição das substâncias ácidas presentes normalmente no leite, ao aumento do ponto de congelamento ( $> -0,530^{\circ}\text{H}$ ), à diminuição da densidade ( $< 1,028$ ) e do ESD ( $< 8,4\%$ ). Em alguns casos, mesmo sendo detectada aguagem pelo crioscópio eletrônico, a densidade, o ESD e a acidez titulável apresentavam-se dentro dos parâmetros de normalidade.

Após a fraude por aguagem, a adição de substâncias alcalinas foi a mais encontrada. A presença de substâncias alcalinas foi, na maioria das vezes, detectada pela prova do alizarol. Os demais procedimentos analíticos oficiais foram ineficientes na sua detecção. A fraude somente foi confirmada na pesquisa de substâncias neutralizantes, utilizando-se o reagente ácido rosólico.

Alguns trabalhos também têm demonstrado a existência de fraudes em leite fluido em outros estados do Brasil (BORGES; PINTO, 2007; DAHMER, 2006; MARTINS et al., 2011a; MARTINS, 2011b; SILVA, 2008), indicando que uma grande quantidade do leite produzido possui algum tipo de adulteração. Nesse contexto, devem ser desenvolvidas novas metodologias que minimizem a fraude já disseminada em nosso país.

## **CONCLUSÃO**

A qualidade do leite pasteurizado comercializado no estado do Rio de Janeiro está comprometida e precisa ser melhorada com base nos sistemas de fiscalização vigente.

As análises oficiais de rotina (AO) não foram eficazes na detecção de irregularidades no leite. Portanto, sempre que houver alteração em algum resultado nas análises oficiais, a indústria de leite ou a indústria de laticínio deverá realizar análises complementares de substâncias neutralizantes da acidez, conservantes e reconstituintes da densidade, ainda que nas outras provas os resultados estejam dentro dos parâmetros permitidos pela legislação, a fim de evitar que leite impróprio para consumo seja comercializado e consumido pela população.

## **REFERÊNCIAS**

BASTOS , L. H. P.; CARDOSO, M. H. W. M.; NOBREGA, A. W.; JACOB, S.C. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. *Caderno de Saúde Coletiva*, v. 19, n. 1, p. 51-60, 2011.

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, DF, 2006.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa, Brasília, DF, 2011.

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: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2007, Gramado. *Trabalhos do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 2007.

CASTRO, P. S. Apostila de Aulas Práticas – MAP 3340. Departamento de Matemática e Física. Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Católica de Goiás, 2005, 25p. Disponível em: <[http://www.ucg.br/site\\_docente/maf/patricia/Apostila%20de%Aula\\_Pratica.pdf](http://www.ucg.br/site_docente/maf/patricia/Apostila%20de%Aula_Pratica.pdf)>. Acesso em 10 out. 2012.

CRUZ, E. N.; SANTOS, E. P. Aguagem do leite: métodos básicos de identificação. In: XI Encontro de Iniciação à Docência, 2008, Paraíba. *Trabalhos do XI Encontro de Iniciação à Docência*, 2008.

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

FERRÃO et al. LS-SVM: Uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Química Nova*, n. 4, v. 30, p. 852-859, 2007.

FILHO et al. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns – PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, n. 2, v. 3, p. 38-46, 2009.

LEMAY, D.G.; RIJNKELS, M.; GERMANY, J.B. Lessons from the bovine genome: Implications for human nutrition and research. *The Journal of Nutrition*, p. 1271-1272, 2009.

MARTINS, P. C. A hora e a vez do leite de qualidade. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/>>. Acesso em 25 out. 2011a.

MARTINS, F.O. Avaliação da composição, da qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em leite UHT. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p043.pdf>>. Acesso em 25 ago. 2011b.

OCB/ES SESCOOP/ES. Fraude em Leite UHT, o famoso leite Longa-Vida. Disponível em: [http://www.ocbes.coop.br/ocb/index.php?module=m\\_noticias&pag=inf\\_noticia&id\\_noticia=1174](http://www.ocbes.coop.br/ocb/index.php?module=m_noticias&pag=inf_noticia&id_noticia=1174). Acesso em 04 out. 2010.

PINA, M. S. L. et al. Técnicas experimentais para identificação de substâncias estranhas presentes no leite de vaca comercializado em Garanhuns. I Congresso Norte-Nordeste de Química, Anais, Natal, 2007.

PELLEGRINI et. al. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. Synergimus Scientifica, n. 1, v. 7, 2012.

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, n. 2, v. 17, p. 29-39, 2012.

SOARES et al. Hábitos de consumo de leite em três municípios do estado do Rio Grande do Norte. Revista Verde. n. 3, v. 5, p. 160-164, 2010.

SILVA, M. C. D., et al. 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.

TRONCO, V.M. Pesquisa de substâncias estranhas ou fraudulentas. Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. Santa Maria: Editora UFSM, 2003. cap. 5, p. 130-140.

### 3.2 VERIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS DE ROTINA E ELETROFORESE SDS-PAGE NA DETECÇÃO DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE LEITE BOVINO AO LEITE DE OUTRAS ESPÉCIES

#### **Detection of adulteration in goat and sheep milk with cow milk by SDS-Page electrophoresis and its relationship with physicochemical parameters of quality**

**WANDERLEY**

In this study, the SDS-PAGE electrophoresis method was tested for qualitative and quantitative detection of cow milk added to goat and sheep milk. The physicochemical parameters used in the routine analytical procedure were evaluated in sheep and goat milk in samples artificially rigged with different concentrations of bovine milk aiming to verify whether they are able to identify this fraud.

#### **Detection of adulteration in goat and sheep milk with cow milk by SDS-Page electrophoresis and its relationship with physicochemical parameters of quality**

CH Wanderley\*; CAConte Junior†; LFMCAquino†; ET Mársico†; CC Almeida†; ACO Silva\*.

\*Laboratory of Inspection and Technology of Milk and Dairy Products; †Laboratory of Physicochemical Control of Animal Products; Faculty of Veterinary; Universidade Federal Fluminense; C. P.: 24230-340; Niterói - RJ - Brazil.

Author for correspondence: Carolina Hood Wanderley. Condomínio Vale de Itaipú, 218, Itaipú, Niterói – RJ, 24340-140. (55)(21)26095205; (55)(21)981030282. carolina\_hood@yahoo.com.br.

## ABSTRACT

The purpose of this paper was to evaluate the SDS-Page electrophoresis method for the qualitative and quantitative adulteration detection of mixed milk (sheep-cow milk and goat-cow milk) and verify whether the physicochemical parameters used in the routine analytical procedures for quality evaluation in sheep and goat milk were useful to identify this fraud. Samples of whole raw milk from goat and sheep were intentionally adulterated with 0.5, 1.0, 5.0, 10 and 25% of cow milk. These samples were evaluated by the SDS-Page electrophoresis and physicochemical parameters to check whether they are able to identify and quantify the fraud. Although some physicochemical parameters were different when compared with pure milk from each species, no differences between these parameters in goat and sheep milk adulterated with different percentages of cow milk were observed when compared to the control sample of goat and sheep milk ( $p > 0.05$ ) independently of the level of fraud used in this study. By the electrophoresis SDS-Page method, an increase in the portion  $\alpha$ 1-casein and a decrease in the portion  $\beta$ -casein were observed. An increase of  $\alpha$ 1-casein was detected from the addition of 0.5% and 5% of cow milk in goat and sheep milk ( $p < 0.05$ ), respectively. For  $\beta$ -casein, the detection limit was higher in both milks. The increase of this protein was detected from 10% and 25% of cow milk in goat and sheep milk ( $p < 0.05$ ), respectively. SDS-Page electrophoresis showed that  $\alpha$ 1-casein was more appropriate for detecting fraud with cow milk in sheep and goat milk.

Keywords: Fraud. Casein. Small ruminant.

## INTRODUCTION

Due to the high cost and the marketing importance, goat and sheep milks are targets of fraud by the addition of cow milk (Pereira et al, 2003; Jesus et al, 2013). Over



the years, several analytical methods have been developed with the objective of identifying the mixture of milk from different species, both in the raw products (De et al, 2011; Calvano et al, 2012; Jesus et al, 2013) and in the dairy already processed (Dias et al, 2009; Guarino et al, 2010; Deet al, 2011).

The methodologies are divided in two groups: one is based on the fat composition and the other in the protein composition (Mayer, 2005; Egito et al, 2006). For the detection of the proteins composition, chromatographic (Borková et al, 2005; Dias et al, 2009), immunological (Richter et al, 1997; Hurley et al, 2004; Dias et al, 2009), based on DNA (Felligini et al, 2005; Lopes-Calleja et al, 2005; Reale et al, 2008) and electrophoretic methods (Egito et al, 2006; Dias et al, 2009) stand out.

Several authors reported the use of electrophoresis to identify fraud by mixing milk from different species (Veloso et al, 2002; Dias et al, 2009). Some of these studies have evaluated changes in the casein electrophoretic profile (Addeo et al, 1990; Cattaneo et al, 1996; Egito et al, 2006) and others found the modification of the whey protein profile (Amigo et al, 1991; Cartoni et al, 1999). In the literature, there are electrophoresis methods for proteins separation such as capillary (Dennis, 1998; Cartoni et al, 1999; Molina et al, 2000), "Lab-on-a-chip" (Jesus et al, 2013), Native-Page (Lee et al, 2004), isoelectric focusing (Krause et al, 1989; Addeo et al, 1990; Sienkiewicz et al, 2006), UREA-Page (Liang et al, 1999; Mayer et al, 2005; Egito et al, 2006) and SDS-Page (Basch et al, 1985; Casper et al, 1998; Egito et al, 2006).

Countries of the European Union (EC 213/2001) use isoelectric focusing for the identification of the mixing milk from different species (Egito et al, 2006). However, most of the Brazilian studies prioritize other electrophoresis techniques, such as UREA-

Page (Furtado et al, 1983; Pereira et al, 2003; Egito et al, 2006) and SDS-Page (Egito et al, 2006; Faleiro et al, 2013).

In fraud by mixing milk, some changes are expected to their normal physicochemical parameters such as acidity, density, freezing point, fat and dry matter, since these parameters are different between each species. However, there are no data on the literature showing that these analytical procedures can identify fraud by mixing milk. Given the relevance of this feedstock and taking into account that many countries, including Brazil, produce dairy products with milk mixture from cow and other species, it is interesting to determine the percentage of each one in the raw milk before the processing; therefore, reducing the number of fraud in dairy products. In this context, the objectives of this study were to verify whether the physicochemical parameters used in the routine analytical procedures in sheep and goat milk were useful to identify this fraud and evaluate the SDS-Page electrophoresis method for the qualitative and quantitative detection of mixed milk (milk sheep-cow milk and goat-cow milk).

## **MATERIALS AND METHODS**

Samples of goat and sheep raw milk were gradually adulterated with cow milk (0.5, 1.0, 5.0, 10 and 25%). Then, they were chilled at controlled temperatures ( $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). All milk samples were obtained from private properties that constantly undergo rigorous control of quality to ensure that no substance was added to the feedstock. This experiment was made in two experimental replicates.

Goat, sheep and cow pure milks (100%) and samples from intentional fraud were submitted to routine analysis (density, freezing point, fat, titratable acidity and total solids) in triplicate. For goat milk, the Normative Instruction 37 (Brazil, 2000) was used, and for sheep milk, the determination of density and freezing point was followed

according to the AOAC (1980), fat according to the ISO 488 (2008) and acidity titratable according to the AOAC (1999).

The SDS-Page was carried out in five stages: extraction, quantification, preparation and running the polyacrylamide gel (Page) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), staining and discolorating the gel.

Criscione et al (2008) described the extraction methodology with some modifications. Milk samples were defatted by centrifugation (1609 RCF/30 min) followed by freezing (-20°C/15 min), which allowed an easy removal of the formed film fat. Protein fractions were separated by isoelectric precipitation. The casein was separated from the whey proteins by acidification with 4N HCl until the pH reached 4.3. Subsequently, the samples were centrifuged (1609 RCF / 30 min), making a physical separation of casein and the whey proteins. The supernatant section was discarded while the decanted portion was resuspended with 30 ml of distilled water. The samples were centrifuged again (1609 RCF / 30 min), making three replications, with the objective of purifying the casein portion of the precipitate. Then, 1% of the total weight from casein portion was extracted and added to a solution of urea and thiourea (8M urea to 2M thiourea).

Protein quantification was performed according to Zor and Selinger (1996) who recommend the dilution of samples in Coomassie Blue G-250® at three proportions (1:1, 1:10 and 1:100) and the reading in a wave-length of 595 and 450 nm. The results were calculated by the division between absorbance obtained in each wave. This method reduces the possibility of error by reading the dye that did not bind to proteins. After determining the appropriate dilution, the samples were diluted in staining solution

(4% SDS, 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 50 mM DTT, 20% glycerol and a pinch bromophenol blue) and frozen at -20°C.

The gel was prepared using 15% of acrylamide. To make this gel, 2.8125 mL of 40% Acrylamide/Bis, 0.067 ml of 10% SDS, 3.35 $\mu$ L of TEMED (Bio-Rad®), 1.67 ml of 1.5M Tris-HCl at pH 8.8 (Sigma Aldrich®), 2.9 mL of water and 33.42  $\mu$ L of 10% ammonium persulfate (Synth®) was added. The solution with 10% of ammonium persulfate was prepared separately in an Eppendorf and added at the end of the preparation to avoid premature polymerization. The stacking gel was prepared with 4% of acrylamide (Sapan et al, 1999).

The running of the gel (200 V, 45 mA for approximately two hours) was made after full polymerization and application of 20 $\mu$ L of sample in each well. For the standard well 5 $\mu$ L of standard molecular weight (Fermentas®) was applied. Then the gels were stained with Coomassie Blue solution G-250 for 24 hours and after were destained with a solution of 20% acetic acid, 20% methanol and 60% distilled water until protein bands were revealed. The SDS-Page was made in triplicate.

The photo documentation was performed by MiniBisTotalLab® and the data were evaluated by TotalLab Quant® software. This software can calculate the different protein fractions from the relation between the intensity of staining and the increase or decrease of the protein concentration.

The data obtained were analyzed by XLSTAT software version 2013.2.03 (Addinsoft, Paris, France). The sensitivity of the physicochemical method and the SDS-Page method was determined using one-way ANOVA at the different concentrations employed. Pearson correlations were used to examine the relationship between SDS-Page and fraud concentrations.

## RESULTS

The mean values of the physicochemical parameters obtained are shown in Table 1. In these official methods, there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) between all the parameters and the samples (control samples of goat and sheep milk and the adulterated samples with 0.5, 1, 5, 10 and 25% of cow milk in goat and sheep milk). However, this difference ( $p < 0.05$ ) occurred among the cow control samples and values of density, fat, total solids in goat milk and values of all parameters in sheep milk.

The electrophoretic profiles of the protein fraction  $\alpha$ 1-casein and  $\beta$ -casein samples of goat and sheep milk are presented in Figure 1. Bands of  $\alpha$ 1-casein (lower band) and  $\beta$ -casein (upper band) are observed in all columns, where the first represents the control (100% goat and sheep milk), followed by 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 100.0% and the column 8 represents the molecular weight standard (Fermentas®).

The average of the intensity values obtained from each protein verified by SDS-Page electrophoresis is shown in Figure 2. For the goat milk, the statistical difference ( $p < 0.05$ ) appeared from 0.5% of fraud by the addition of cow milk when the observed protein portion was  $\alpha$ 1-casein and from 10% when the observed protein portion was  $\beta$ -casein. Different from sheep milk, which noted the same adulteration from 5% when the observed portion was  $\alpha$ 1-casein and 25% when analyzing  $\beta$ -casein.

There was a direct high correlation to the goat  $\alpha$ 1-casein ( $r = 0,7678$ ) and to the sheep  $\alpha$ 1-casein ( $r = 0,7870$ ). For  $\beta$ -casein an inverse high correlation for the goats ( $r = -0,8122$ ) and an inverse medium correlation for sheep milk ( $r = -0,6215$ ) were detected.

## DISCUSSION

The results of the research showed that the physicochemical parameters were not useful to identify 25% or less of cow milk added to goat and sheep milk since they

showed no statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the increase in cow milk added to goat and sheep milk and the respectively control samples in all routine analyses. However, differences ( $p < 0.05$ ) were found in density, fat and total solids between the samples from pure goat milk and pure cow milk. From samples of pure sheep milk, all the parameters were statistically different ( $p < 0.05$ ) from pure bovine milk. Because of this, it is believed that with higher concentrations of cow milk added, this difference would be detected. These data explain how easy it is to perform this adulteration and demonstrate the necessity of using a more accurate analytical method to identify the milk mixture. There is no data in the national or international literature that correlate some differences in the physicochemical parameters and the cow milk added to goat or sheep milk.

According to Veloso et al (2002), the electrophoresis can be applied to detect adulteration in dairy products because of its high sensitivity. The relation between the intensity and the concentration of the protein portion  $\alpha_1$  and  $\beta$  casein makes this fraud detection possible. Therefore, the total precipitation of casein is an important step to the methodology. Different from what is stated in the literature (Basch et al, 1985; Egito et al, 2006; Bossu, 2009), it was found that the use of a pH 4.6 does not enable the precipitation of all milk casein, causing the possibility of under quantification. The best pH for the total precipitation was reached with pH 4.3, as described by Veloso (2001). This precipitation was complete because the isoelectric point of goat casein milk is around 4.2 (Sannier et al, 2000).

Examining Figure 1, the main protein bands of casein can be observed. In the protein profile, there are some protein bands with apparent molecular mass similar to  $\alpha_1$  (24 kDa) and  $\beta$  caseins (32 kDa), showing a relationship between their intensities and the increase in the concentrations of cow milk added to goat and sheep milk. The

apparent molecular weight was obtained with the aid of TotalLab Quant software. However, many authors have reported the apparent molecular mass for  $\alpha$ 1-casein as 23,6kDa and  $\beta$ -casein as 24kDa (VeloSo, 2001; Sgarbieri, 2005; Rossa, 2010). When relating the molecular weight and relative mobility of the standard, Bossu (2009) found a line equation, which allowed the identification of the apparent molecular weight  $\alpha$ 1-casein as 24 kDa and  $\beta$ -casein as 32 kDa. This fact is in agreement with the data found in this study.

Observing the control sample of cow milk, the bands corresponding to  $\alpha$ 1-casein showed greater color intensity than the other samples with different concentrations of goat and sheep milk and its respectively control samples, where the corresponding bands were lighter. Indeed, different from what occurred for the control samples of goat and sheep milk, which showed greater color intensity in the  $\beta$ -casein. This can explain why the control samples of goat and sheep milk showed a higher ratio  $\beta$ -casein/ $\alpha$ 1-casein when compared to control samples of cow milk (Egito et al, 2006; Salem et al, 2009; Yuksel et al, 2012). Carrying out the electrophoresis SDS-Page, Egito et al (2006) and Yuksel et al (2012) also found a higher intensity in the  $\beta$ -casein band in goat samples than in cow samples. The statistical differences ( $p < 0.05$ ) were obtained between the control sample of goat and sheep milk and the control sample of cow milk.

For the goat  $\alpha$ 1-casein band, the statistical difference ( $p < 0.05$ ) was observed from 0.5% of cow milk added. The increased intensity could be detected in this insignificant concentration because goat milk has low concentrations of  $\alpha$ 1-casein, which allows fraud detection even in small concentrations (Jandal,1996). Researching the  $\alpha$ 1-casein portion by UREA-Page method, VeloSo (2001), Pereira et al (2003) and Egito et al (2006) reached levels of fraud detection different from the present study, 5%,

4.5% and 2.5%, respectively. This difference probably occurs because the UREA-Page does not use 2-mercaptoethanol and DTT to denature proteins. Furthermore, separation of proteins by this method is given by the difference of electric charge, unlike SDS-Page, which is given by the difference of molecular weight of the protein (Dias et al, 2008). Studying the  $\alpha$ 1-casein by capillary electrophoresis methodology, Cattaneo et al (1996) detected the fraud from 1% of cow milk added to goat and sheep milk. The values found by capillary electrophoresis and SDS-Page electrophoresis differ because the different methodologies were employed.

In the goat  $\beta$ -casein band, a statistical difference ( $p < 0.05$ ) was observed from 5% of cow milk added. Even with a low detection limit, there is no data in the national or international literature that correlates the decrease in goat  $\beta$ -casein with the fraud by the addition of bovine milk.

Concerning the sheep  $\alpha$ 1-casein band, a statistical difference ( $p < 0.05$ ) was observed from 10% of cow milk added. The fraud could be detected in lower concentrations of  $\alpha$ 1-casein than of  $\beta$ -casein because, like the goat milk, the sheep milk has low concentrations of the first protein fraction, allowing a lower concentration of this protein necessary for detecting the fraud. Analyzing the  $\alpha$ 1-casein portion by UREA-Page method, Veloso (2001) obtained levels of fraud detection different from the present study, 5% of cow milk added in sheep milk. This difference may have occurred because of the different method of protein extraction or because of the different method used in both studies. The same author tried to detect this fraud with HPLC, but did not detect any cow milk added to sheep milk. This shows that the electrophoresis method is more effective to identify this adulteration (Veloso, 2001). Cattaneo et al (1996), using the capillary electrophoresis to detect cow milk added in



sheep milk, verified the fraud from 8%. As said for goat  $\alpha$ 1-casein, this difference happened because of the difference of the methodologies used in each paper.

Regarding sheep  $\beta$ -casein band, a statistical difference ( $p < 0.05$ ) was observed from 25% of cow milk added. There is no data in the national or international literature to identify fraud for mixed milk using the  $\beta$ -casein portion to this species.

It is noteworthy that, during the processing, most cheese has the hydrolysis process that could break the  $\alpha$ 1-casein and/or the  $\beta$ -casein, masking the real quantity of protein (Veloso, 2001). Therefore, in the analysis of fraud by mixing milk in cheese, the values found in this paper can be changed.

## CONCLUSIONS

The parameters used in the analytical industries routine showed no sensitivity to characterize fraud under the conditions of this study. The SDS-Page electrophoresis method proved to be efficient to identify fraud by addition of cow milk in goat and sheep milk and could quantify levels of this fraud. The detection of  $\beta$ -casein portion has shown to be effective to identify cow milk added to the goat and sheep milk. However, because of the statistical difference and the higher correlation between the percentage of fraud and the protein portion, the  $\alpha$ 1-casein showed to be more effective to detect the fraud of cow milk added to goat and sheep milk.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for financial support from the State of Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho Research Foundation (FAPERJ), processes number E-26/112.393/2012 and E-26/103.003/2012.C.H. Wanderley was supported by the Coordination for Higher-Level Training (CAPES).

## REFERENCES

- Addeo, F., Moio, L., Chianese, L. 1990. Use of plasmin to increase the sensitivity of the detection of bovine milk in cheese by gel isoelectric focusing of  $\alpha_2$ caseins. *Milchwissenschaft*.45:708-711.
- Amigo, L., Ramos, M., Martin-Alvarez, P.J. 1991. Effect of technological parameters on electrophoretic detection of cow's milk in ewe's milk cheeses. *J. Dairy Sci.*74: 1482-1490.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, 13th ed. Washington, D.C., 1980.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, 15th ed. Airlington, Virginia, 1999.
- Basch, J.J., Jr. Douglas, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H., Jr. Farrell, H. M. Quantification of casein and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *J. Dairy Sci.* 68: 23-31.
- Borková, M., Snaselová, J. 2005. Possibilities of Different Animal Milk Detection in Milk and Dairy Products – a Review. *Czech J. Food Sci.*23: 41-50.
- Bossu, C. M. 2009. Fracionamento de zinco em amostras de leite. Dissertação apresentada à UFSCar, São Carlos – SP. 105p.
- Brasil. Instrução Normativa n° 37, de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 08 de nov. 2000, p.23-25.
- Calvano, C.D., De Ceglie, C., Monopoli, A., Zambonin, C.G. 2012. Detection of sheep and goat milk adulteration by direct MALDI-TOF MS analysis of milk tryptic digests. *J. Mass Spectrom.*47: 1141-1149.

- Cartoni G., Coccioli, F., Jasionowska, R., Masciet M. 1999. Determination of cow's milk in goat's milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *J. Chromatogr. A.* 846:135-141.
- Casper, J. L.; Wendorff, W. L.; Thomas, D. L. 1998. Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *J Dairy Sci.* 81:3117–3122.
- Cattaneo, T.M.P., Nigro, F., Greppi, G.F. 1996. Analysis of cow, goat and ewe milk mixtures by capillary zone electrophoresis (cze): preliminary approach. *Milchwissenschaft.* 51:616 – 619.
- Criscione A., Cunsolob, V., Bordonaro, S., Guastellaa, A.M., Salettib, R., Zuccarola, A., D'Ursoa, G., Marletta, D. 2008. Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *Int Dairy J.* 19: 190 - 197.
- De, S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., Singh, K.P., Singh, R., Datta, T.K., Goswami, S.L. 2011. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control.* 22: 690-696.
- Dennis, M.J. 1998. Recent developments in food authentication. *Analyst.* 9: 151-156.
- Dias, S.S, Lobato, V., Bernardini, M.R.V. 2009. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 3: 327-333.
- Egito, A.S., Rosinha, G.M.S., Laguna, L.E., Miclo, L., Girardet, J.M., Gaillard, J.L. 2006. Método eletroforético rápido para detecção de adulteração de leite caprino com leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58: 932-939.

European Commission (EC). 2001. Regulation. Journal Commun. Europeaia No. 44:L.37/1 - L37/99.

Faleiro, A. S. 2013. Caracterização eletroforética, composição centesimal e propriedades físicas para verificação da autenticidade da muçarela de búfala comercializada no estado da Bahia. Dissertação apresentado à UESB. Itapetinga, Ba, Brasil. 72p.

Felligini, M., Bonizzi, I., Curik, V.C., Parma, P., Greppi, G.F., Enne, G. 2005. Detection of adulteration in Italian Mozzarella cheese using mitochondrial DNA templates as biomarkes. Food Technol Biotech. 43: 91-95.

Furtado, M.M. 1983. Detection of cow milk in goat milk by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Dairy Sci. 66: 1822-1824.

Guarino, C., Fuselli, F., La Mantia, A., Longo, L., Faberi, A., Marianella, R.M. 2010. Peptidomic approach, based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, for detecting sheep's milk in goat's and cows's cheese. Rapid Commun Mass Sp. 24:705-713.

Hurley, I.P., Coleman, R.C., Ireland, H.E., Williams, J.H.H. 2004. Measurement of bovine igG by indirect Competitive ELISA as a means of detection milk adulteration. J. Dairy Sci. 87: 543-549.

*ISO 488. 2008. Milk. Determination of fat content. Gerber butyrometers.*

Jandal, J.M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. Small Ruminant Res. 22: 177-185.

Jesus, D.C. 2013. Uso da tecnologia de eletroforese "lab-on-a-chip" em leite caprino com adição de leite bovino. TCC apresentado à UFP. Curitiba – Pr, Brazil. 79p.

Krause, I., Berner, I., Klostermeyer, H. 1989. Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte-and carrier ampholyte/immobilized ph

gradient-isoelectric focusing of caseins using plasminas signal amplifier. *Electrophoresis*.89: 389-393.

Lee, C., Chang, H., Sheen, H. 2004.A quick novel method to detect the adulteration of cow milk in goat milk.*Asian-australas. J. Anim. Sci.* 17: 420-422.

Liang, I. and S. N. Huang. 1999. Detection of cow's milk in goat's milk by urea polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Taiwan Livest. Res.* 32: 153-159.

López-Calleja, I., Alonso, I.G., Fajardo, V., Rodriguez, M.A., Hernandez, P.E., Garcia, T., Martin, R. 2005.PCR detection of cow's milk in water buffalo milk and Mozzarella cheese. *Int Dairy J.*15: 1122-1129.

Mayer H.K. 2005. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *Int Dairy J.*15: 595-604.

Molina, E., De Frutos, M.,Ramos, M. 2000. Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cow's, ewes' and goats' milks. *J. Dairy Res.*67: 209-216.

Pereira, D.B.C., Furtado, M.A.M., Abreu, L.R., Arcuri, E.F. 2003. Utilização de técnicas de eletroforese em gel de poliácrilamida na identificação da adição de leite de vaca ao leite de cabra. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes.* 58: 1-9.

Reale, S., Campanella, A., Merigioli, A., Pilla, F. 2008.A novel method for species identification in milk and milk-based products.*J. Dairy Res.* 75: 107-112.

Richter, W., Krause, I.,Graf,C., Sperrer, I., Schwarzer, C., Klostermeyer H. 1997. An indirect competitive ELISA for the detection of cow's milk and caseinate in goat's and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine  $\gamma$  - caseins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 204: 21-26.

Rossa, P. N. Influência da enzima transglutaminase microbiana nas propriedades funcionais de sorvetes com diferentes teores de gordura. Dissertação apresentada à UFSC. Florianópolis, SC, Brasil. 117p.

*Salem, S.A.; El-Agamy, E. I. ;Salama, F. A.; Abo-Soliman, N. H. 2009. Isolation, molecular and biochemical characterization of goat milk casein and its fractions. Trop. subtrop. agroecosyst. 11: 29-35.*

Sannier, F., Bordenave, S. e Piot, J.M. 2000. Purification of goat (3-lactoglobulin from whey by an ultrafiltration membrane enzymic reactor. *J. Dairy Res.* 61: 43-51.

Sapan, C.V.; Lundblad, R. L.; Price N. C. 1999. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 99-108.

Sgarbieri, V.C. 2005. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Braz. J. Food Technol.* 8: 43-56.

Sienkiewicz, T., Dogan, M., Kroh, L.W. 2006. Investigation of proteins in ewe, goat and cow cheeses by gel isoelectric focusing. *Pol J Food Nutr.* 15: 203-207.

Veloso, A. C. A. 2001. Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por UREIA-PAGE. Dissertação apresentada à UP. Porto, Portugal. 141p.

Veloso, A.C.A, Teixeira, N., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira, M.A. 2002. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quim. Nova.* 4: 609-615.

Yuksel, Z., Avci, E., Uymaz, Erdem, Y.K. 2012. General composition and protein surface hydrophobicity of goat, sheep and cow milk in the region of Mount Ida. *Small Ruminant Res.* 106: 137-144.

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

## Wanderley, C.H. – Table 1

Table 1. Average of the minimum and maximum values of titratable acidity, density, freezing point, fat and total solids from raw whole goat and sheep milk intentionally adulterated with different levels of cow milk (0, 0.5, 1, 5, 10, 25%)

Treatment control	Goat milk					Sheep milk				
	Titratable Acidity (°D)	Density	Freezing Point (°H)	Fat (%)	Total Solids	Titratable Acidity (°D)	Density	Freezing Point (°H)	Fat (%)	Total Solids
0%	14a	1,0302a	-0,55545a	4,6a	13,81a	18 a	1,0364a	-0,56615a	8a	15,05a
	14-14	1,0300 - 1,0304	(-0,55543) - (-0,55548)	4,6 - 4,7	13,80 - 13,83	18-18	1,0360 - 1,0366	(-0,56610) - (-0,56622)	8,0-8,0	15,00 - 15,08
0,50%	14a	1,0302a	-0,55275a	4,65a	13,87a	17 ab	1,0364a	-0,56965a	8a	15,00a
	14-14	1,0301 - 1,0303	(-0,55273) - (-0,55276)	4,5 - 4,7	13,80 - 13,89	17-18	1,0360 - 1,0368	(-0,56955) - (-0,56970)	8,0-8,0	14,99-15,05
1%	15a	1,0296a	-0,5525a	4,7a	13,76a	17ab	1,0364a	-0,57045a	8a	14,95a
	14-15	1,0294 - 1,0298	(-0,5523) - (-0,5527)	4,5 - 4,8	13,73 - 13,80	17-18	1,0360 - 1,0366	(-0,57040) - (-0,57060)	7,9-8,0	14,90 - 15,00
5%	15a	1,0298a	-0,5534a	4,55a	13,64a	17ab	1,0366a	-0,5685a	7,9a	15,04a
	14-15	1,0295 - 1,0230	(-0,55331) - (-0,55336)	4,3 - 4,6	13,60 - 13,68	17-17	1,0360 - 1,0368	(-0,05675) - (-0,5690)	7,7-7,9	14,90 - 15,07
10%	15a	1,03a	-0,5523a	4,5a	13,63a	16ab	1,0366a	-0,57065a	7,8a	14,97a
	14-15	1,0297 - 1,0232	(-0,5520) - (-0,5525)	4,3 - 4,6	13,58 - 13,65	16-16	1,0363 - 1,0370	(-0,57050) - (-0,57075)	7,7-7,9	14,90 - 15,00
25%	15a	1,031a	-0,5516a	4,5a	13,92a	17ab	1,0354a	-0,56915a	7,7a	14,51a
	15-15	1,0299 - 1,033	(-0,5513) - (-0,5519)	4,2 - 4,5	13,65 - 14,00	16-17	1,0350 - 1,0360	(-0,56910) - (-0,56925)	7,68-7,72	14,50-14,60
100%	15a	1,0326b	-0,551a	3,5b	13,17b	15b	1,0326b	-0,54425b	3,5b	9,67b
	15-15	1,0324 - 1,0328	(-0,549) - (0,5512)	3,2 - 3,6	13,15 - 13,20	15-15	1,0324 - 1,0328	(-0,549) - (0,5512)	3,2 - 3,6	13,15 - 13,20

<sup>a, b, c</sup> Different letters within a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) within each analysis among different treatments (ANOVA).

The treatment 0% is the control of goat and sheep milk containing 100% of the milk of these species. Treatments 0.5, 1, 5, 10 and 25% have their respective concentrations of cow milk. The treatment 100% is the control of cow milk, with 100% cow milk.

Wanderley, C.H. – Figure 1

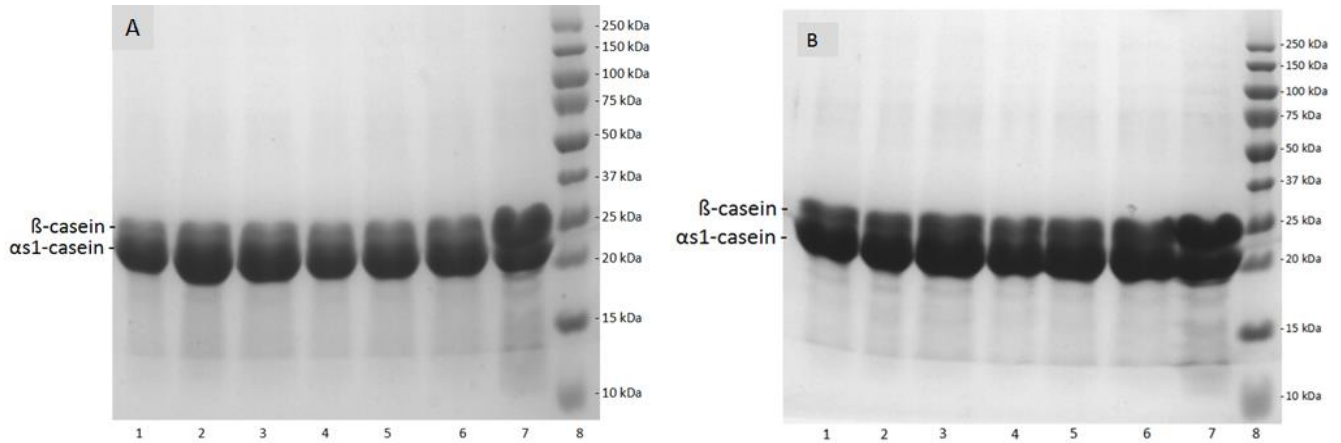


Figure 1. Electrophoresis profile of raw goat milk protein (A) and sheep milk protein (B) and their fractions adulterated with 0,5; 1; 5; 10; 25 e 100% of cow milk. Column 1: 100% of goat (A) or sheep (B) milk; column 2: 95,5 % of goat (A) or sheep (B) milk and 0,05% of cow milk; column 3: 99% of goat (A) or sheep (B) milk and 1% of cow milk; column 4: 95% of goat (A) or sheep (B) milk and 5% of cow milk; column 5: 90% of goat (A) or sheep (B) milk and 10% of cow milk; column 6: 75% of goat (A) or sheep (B) milk and 25% of cow milk; column 7: 100% cow milk; column 8: Standard molecular weight: 1-250, 2-150, 3-100, 4-75, 5-50, 6-37, 7-25, 8-20, 9-15, 10-10.



Wanderley, C.H. – Figure 2

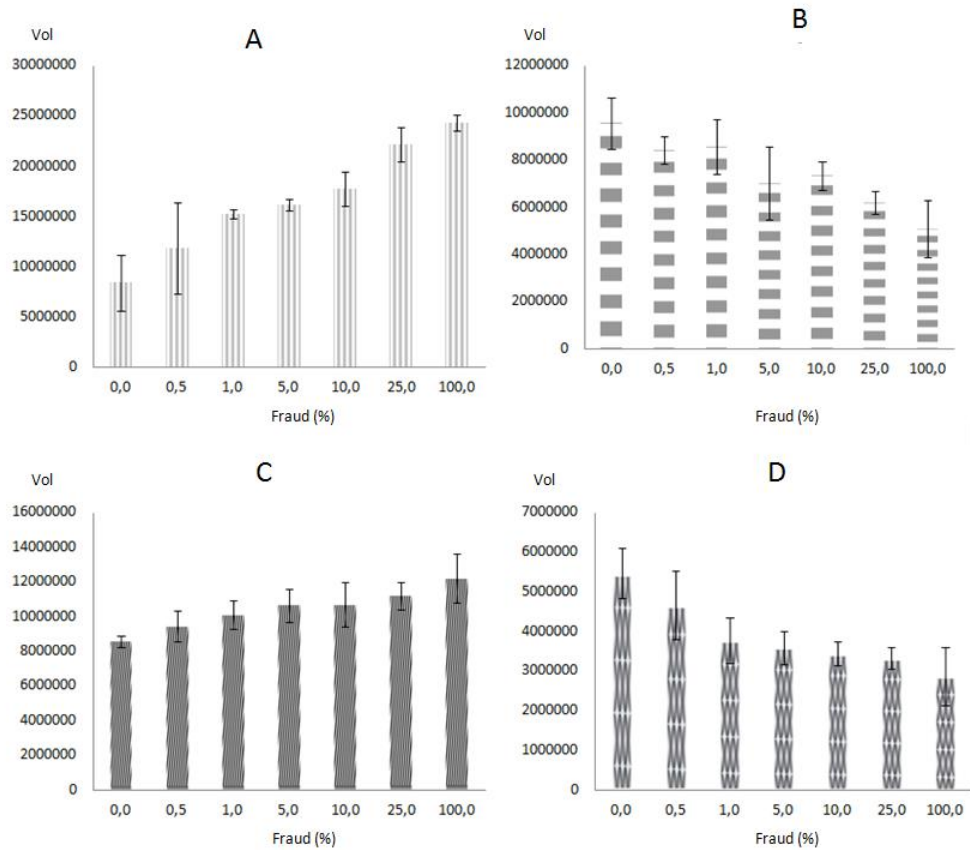


Figure 2. Intensity of  $\alpha$ 1-casein from goat (A) and sheep (C) milk and  $\beta$ -casein from goat (B) and sheep (D) milk adulterated with different percentages of cow milk (0, 0.5, 1, 5, 10, 25 and 100%) by electrophoresis SDS-Page. Data from two replicates in triplicate

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que as análises oficiais de rotina (AO) não foram eficazes na detecção de irregularidades no leite bovino, apenas sugerem alguma adulteração. Em casos de pequenas alterações é importante a investigação através das análises de detecção de fraude (DF). Além disso, observou-se a péssima qualidade do leite comercializado no mercado varejista do estado do Rio de Janeiro, onde 83,3% (25) das marcas do leite UAT e apenas 6,66% (1) do leite pasteurizado obtiveram valores compatíveis com a qualidade preconizada pela legislação. Na identificação de fraude por adição de leite bovino adicionado ao leite caprino e ovino a técnica de Eletroforese SDS-PAGE se mostrou bastante eficaz, conseguindo identificar a fraude em concentrações superiores a 0,5% de leite bovino adicionado ao leite caprino e 5% de leite bovino adicionado ao leite ovino. A porção  $\alpha$ 1-caseína se mostrou a fração mais adequada para identificar e quantificar a fraude por mistura de leites.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUIAR, C. L.; CORÓ, F. A. G.; PEDRÃO, M. R. Componentes ativos de origem animal. *Boletim do Ceppa*, v. 23, n. 2, p. 413-434, 2005.

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.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, 13th ed. Washington, D.C., 1980.

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists, 15th ed. Airlington, Virginia, 1999.

AQUINO, L. F. M. C. *Estudo da fraude com soro de queijo em leite através das metodologias de ácido siálico livre, eletroforese SDS-PAGE e análise sensorial*. 2013. p. 71. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, NITERÓI. 2013.

BEUX, S. *Apostila de Tecnologia de Leite e Derivados*. Disponível em: < <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAGJsAK/apostila-sobre-leite> > Acesso em 11 set. 2012.

BEZERRA, M. F.; CORREIA, R. T. Análise descritiva quantitativa e aceitação sensorial de iogurte obtido pela mistura de leite caprino e bubalino. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 1, p. 140-147, 2012.

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: 35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 35. 2008. Gramado. *Trabalhos do 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*, v. 37, p. 39-44, 2009.

BRAMMER, S. P. *A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas*. Disponível em: < [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do06.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm) >. Acesso em: 30 de dez. de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 23-25, 08 de nov. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Aprova os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.8, 14 dez. 2006. Seção I

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Aprovado pelo decreto n. 30.691, 29/03/52, alterado pelos decretos n.1255 de 25/06/62, 1236 de 01/09/94, 1812 de 08/02/96, 2244 de 04/06/97. Brasília, 2008. 241 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.6, 30 dez. 2011. Seção I.

BURNS; E. W. C. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p. 782.

CARTONI G.; COCCIOLI, F.; JASIONOWSKA, R.; MASCI, M. Determination of cow's milk in goat's milk and cheese by capillary electrophoresis of the whey protein fractions. *Journal of Chromatography A*, n. 846, p. 135-141, 1999.

CASPER, J. L.; WENDORFF, W. L.; THOMAS, D. L. Seasonal changes in protein composition of whey from commercial manufacture of caprine and ovine specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, n. 81, p. 3117–3122, 1998.

CHANDAN, R. C.; ATTAIE, R.; SAHANI, K. M. *Nutritional aspects of goat milk and its products*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN GOAT'S, 5., 1992, New Dehli. Proceedings...New Dehli, 1992.

CLARCK, S.; SHERBON, J.W. Alpha s1-caseina, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*, v. 38, p. 123-134, 2000.

CORDEIRO, P.R.C.; CORDEIRO, A.G.P.C.; COSTA, M.G. - Produção e mercado de leite caprino. In: VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ESPECIALISTAS EN PEQUEÑOS RUMIANTES Y CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS. 8., 2013, Campo Grande. 2013.

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 Agrárias/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.

DENNIS, M. J. Recent developments in food authentication. *Analyst*, n.9, p. 151-156, 1998.

DIAS, S.S, LOBATO, V., BERNARDINI, M.R.V. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, n. 3, p. 327-333, 2009

DIAS, S. S.; NOGUEIRA, L. C.; REIS, R. C. S.; BARBOSA, C. G. Avaliação da disponibilidade e rotulagem de derivados de leite de búfala nas diferentes estações do ano comercializados na zona oeste do Rio de Janeiro. *Alimentos e Nutrição*, v. 23, n. 3, p. 421-426, 2012.

.EGITO, A.S., ROSINHA, G.M.S., LAGUNA, L.E., MICLO, L., GIRARDET, J.M., GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção de adulteração de leite caprino com leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 932-939, 2006.

EMBRAPA. *Produção Mundial de Leite de Diferentes Espécies de Animais – 2010/2011*. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatistica/producao/tabela0210.php>>. Acesso em 28 de maio de 2012.

EMBRAPA. *Conjuntura do Mercado Lácteo*. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013\\_02\\_Com%C3%A9rcio%20Internacional\\_Leite.pdf#page=3](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_Com%C3%A9rcio%20Internacional_Leite.pdf#page=3)>. Acesso em 04 de março de 2013a

FAO. *Composição do leite*. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/consumo/tabela0707.php>> Acesso em: 04 set. 2012.

FISBERG, M.; NOGUEIRA, M.; FERREIRA, A. M. A.; FISBERG, R. M. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. *Pediatria Moderna*, v. 35, n. 7, p. 526-530, 1999.

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. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *INRA EDP Sciences*, n. 84, p. 501–512, 2003.

GALLAGHER, S. R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins UVP. *Current Protocols in Protein Science*, n. 10. p. 1-44, 2007.

GUERRA, I. C. D., OLIVEIRA, C. E. V.; MAIA, J. M.; LIMA, F. A.; QUEIROGA, R. A. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G.; BARBOSA, J. G.; FERNANDES, M. F.; SOUZA, E. D.; FILHO, E. C. P.; NETO, S. G. Análise comparativa da composição centesimal de leite bovino, caprino e ovino. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 10., 2007, Areia. *Anais...* Areia: Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde, 2007.

HAENLEIN, G.F.W. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 9, p. 2097-2115, 2001.

HSIEH, J.; YU, C.; TSAI, T. Proteomic profiling of the coagulation of soymilk proteins induced by magnesium chloride. *Food Hydrocolloids*, v. 29, n. 1, p. 219-225, 2012.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). *Pesquisa da Pecuária Municipal e Censo Agropecuário*. Disponível em: < [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>. Acesso: 12 de dezembro 2012.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). *Aquisição alimentar domiciliar per capita anual, por classes de rendimento total e variação patrimonial mensal familiar, segundo os produtos*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso: 04 de março de 2013.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). *Produção leiteira no Brasil*. Disponível em: <[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3709.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3709.pdf)>. Acesso em: 02 de fev. de 2014.

ISO 488. 2008. Milk. Determination of fat content. Gerber butyrometers.

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

KRAUSE, I., BERNER, I., KLOSTERMEYER, H. Sensitive detection of cow milk in ewe and goat milk and cheese by carrier ampholyte-and carrier ampholyte/immobilized ph gradient-isoelectric focusing of caseins using plasminas signal amplifier. *Electrophoresis*, v. 89, p. 389-393, 1989

LIANG, I. AND S. N. HUANG. Detection of cow's milk in goat's milk by urea polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Taiwan Livestock Research*, v. 32, p. 153-159, 1999.

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. *Brasil Alimentos*, n.7, p. 34-36, 2002.

MACHADO S. C. *Fatores que afetam a estabilidade do leite bovino*. Porto Alegre, 2010. 190 p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia. Universidade da Região da Campanha, Porto Alegre, 2010.

MAIA, G. B. S.; PINTO, A. R.; MARQUES, C. Y. T.; ROITMAN, F. B.; LYRA, D. D. Produção leiteira no Brasil. *BNDES Setorial*, n. 37, p. 371-398, 2012.

MARTINS, M. P. R. V.; MIMOSO, M. C. E. M. Leite de ovelha da região de Azeitão. Trabalhos desenvolvidos no Núcleo de Tecnologias de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia dos Produtos Agrários do EAN. *Investigação Agrária*, 2000.

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](http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p043) >. Acesso em 13 de out de 2010.

MAYER H.K. Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic, chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 595-604, 2005.

MILKNET. *Brasil é o terceiro maior produtor de leite*. Disponível em: <<http://www.milknet.com.br/?pg=noticia&id=22616&buscador=BRASIL-E-O-TERCEIRO-MAIOR-PRODUTOR-DE-LEITE&local=1>>. Acesso em: 15 de jan. de 2014

MOLINA, E., DE FRUTOS, M., RAMOS, M. Capillary electrophoresis characterization of the casein fraction of cheeses made from cow's, ewes' and goats' milks. *Journal of Dairy Research*, v. 67, p. 209-216, 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.

ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280 p.

PENNA, C.F.A.M. *Produção e parâmetros de qualidade de leite e queijos de ovelhas lacaune Santa Inês e suas mestiças submetidas a dietas elaboradas com soja ou linhaça*. 2011. p. 155. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

PEREIRA, G. A. P.; GENARO, P. S.; PINHEIRO, M. M.; SZEJNFELD, V. L.; MARTINI, L. A. Cálcio dietético – estratégias para otimizar o consumo. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 49, n. 2, p.160-175, 2009.

PIGNATA, M. C. *Queijo muçarela de búfala elaborado com inclusão de leite de vaca: qualidade nutricional e instrumental*. 2013. 86 p. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia, Bahia, 2013.

PINA, L. C. Poder de compra e consumo de lácteos no Brasil. Fórum das Américas: Leites e Derivados. Disponível em: < [http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2010\\_07\\_poder%20de%20compra%20e%20consumo.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2010_07_poder%20de%20compra%20e%20consumo.pdf) >. Acesso em: 20 de dez. de 2013.

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.

PRATES, J.A.M.; MATEUS, C.M.R.P. Functional foods from animal sources and their physiologically active components. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 153, n. 3, p. 155-160, 2002.

- RAMOS M.; JUAREZ M. Update on existing analytical methods for detecting mixture of cow's, ewe's and goat's milk. *Bull Fed Int Lait.*, v. 181, p. 1-9. 1984.
- RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, v. 79, p. 52-72, 2008
- RIBEIRO, C.L. *Produção, composição e rendimento em queijos do leite de ovelhas santa Inês*. 2005. p. 77. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2005.
- ROBIM M. S. *Avaliação de diferentes marcas de leite UAT comercializadas no estado do rio de janeiro e o efeito da fraude por aguagem na fabricação, composição e análise sensorial de iogurte*. 2011. 97 p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.
- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf>>. Acesso em: 20 de dez. de 2013
- ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos . *Indicadores Econômicos FEE*, v. 39, n. 2, p. 97-114, 2011.
- 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*. 1997. p. 39 (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.
- SIENKIEWICZ, T., DOGAN, M., KROH, L.W. Investigation of proteins in ewe, goat and cow cheeses by gel isoelectric focusing. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, v. 15, p. 203-207, 2006.
- SILVA, P.H.F. Leite: Aspectos de composição e propriedades. *Química Nova na escola*. n. 6, p. 3-5, 1997.
- SILVA C.L.S. P. Eletroforese bidimensional: princípios e aplicações. *Ciências Agrárias*, v. 2, n. 1, p. 74 – 78, 2002.
- 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, P.V. *Leite caprino: caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e avaliação biológica (ratos fêmeas wistar)*. 2009. p. 156. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2009.

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.

SOUAGRO. *No Dia Mundial do Leite, iniciativa busca divulgar benefícios do produto*. Disponível em: <<http://souagro.com.br/no-dia-mundial-do-leite-iniciativa-busca-divulgar-beneficios-do-produto/>>. Acesso em: 15 de nov. de 2012

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.

SWISS MILK. *Consumo de Leite no Mundo*. Disponível em: <<http://www.swissmilk.ch/de.html>>. Acesso em: 04 de mar. de 2013

TRONCO, V.M. *Pesquisa de substâncias estranhas ou fraudulentas*. In:\_\_\_\_\_ Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. 4 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2003. 206 p. cap. 5, p. 130-140.

VALSECHI, O.A. *O leite e seus derivados*. In: Tecnologia de produtos de origem animal. Disponível em:< <http://www.cca.ufscar.br/docentes/vico>>. Acesso em: 03 set 2012.

VELOSO, A. C. A. *Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por UREIA-PAGE*. 2001. p. 141. Dissertação (mestrado em Controle de Qualidade) Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, Portugal. 2001.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Química Nova*, v. 25, n. 4, 2002.

WANDERLEY, C. H.; SILVA, A. C. O.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T.; CONTE-JUNIOR, C. A. Avaliação da Sensibilidade de Métodos Analíticos Para Verificar Fraude em Leite Fluido. *Revista de Ciências da Vida*, v. 32, n. 2, p. 34-42, 2012.

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

## 6 APENDICES FINAIS

### 6.1 ARTIGO PUBLICADO

#### Avaliação da Sensibilidade de Métodos Analíticos Para Verificar Fraude em Leite Fluido

*Carolina Hood Wanderley*<sup>1</sup>

*Adriana Cristina de Oliveira Silva*<sup>2</sup>

*Flávia Emily Rodrigues da Silva*<sup>3</sup>

*Eliane Teixeira Mársico*<sup>4</sup>

*Carlos Adam Conte Junior*<sup>4</sup>

#### RESUMO

WANDERLEY, C. H.; SILVA, A. C. de O.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T. M.; CONTE JUNIOR, C. A. Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido. No presente estudo foi avaliado o comportamento dos métodos analíticos oficiais de rotina (AO) (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, densidade relativa a 15°C e crioscopia) e de detecção de fraudes (DF) utilizadas para leite fluido. Para a determinação da sensibilidade das análises (AO e DF), amostras de leite foram experimentalmente adulteradas com diversas concentrações de amido de milho (0,25 a 1%), NaCl (0,05 a 1%), substâncias alcalinas (0,05 a 1%), cloro (0,3 a 1%) e água (0,3 a 5%). Foram observadas alterações dos padrões físico-químicos pelos AO nas fraudes contendo 0,4% de água, 0,06% de cloretos, 0,06% de neutralizantes da acidez e 0,4% de cloro, não sendo possível detectar alteração no leite fraudado com 0,06% de amido de milho. Na determinação de substâncias adicionadas ao leite (DF), os níveis mínimos de detecção encontrados foram de 0,06% de NaCl, 0,4% de cloro, 0,25% de amido, 0,06% de neutralizantes da acidez e 0,4% de água. Além disso, foi avaliada a presença desses tipos de fraudes no leite fluido (pasteurizado e UAT) comercializado no estado do Rio de Janeiro. No mercado varejista, foram obtidas 135 amostras de 30 marcas de leite UAT e 15 marcas de leite pasteurizado, das quais, 83,3% (25) das marcas do leite UAT e apenas 6,66% (1) do leite pasteurizado obtiveram valores compatíveis com a qualidade preconizada considerando os limites propostos pela legislação.

Palavras-chave: leite; fraudes; análises físico-químicas.

#### ABSTRACT

WANDERLEY, C. H.; SILVA, A. C. de O.; SILVA, F. E. R.; MÁRSICO, E. T. M.; CONTE JUNIOR, C. A. Evaluation of the sensitivity of analytical methods for identifying fraud in fluid milk. In this work it was evaluated the behavior of official routine analytical methods (lipid/fat, nonfat dry, titratable acidity, relative density at 15 ° C and freezing point) and fraud detection generally used for fluid milk. To determine the sensitivity of the analysis, milk samples were experimentally tampered with various concentrations of corn starch (0.25 1%), NaCl (0.05 to 1%), alkalis (0.05 1%), chlorine (0.3 to 1%) and water (0.35%). There were alterations observed in the physicochemical patterns composition of the fraudulent samples containing 0.4% of water, 0.06% of chloride, 0.06% of acidity neutralizing and 0.4% of chlorine. Official analytical procedures were unable to detect changes in adulterated milk with 0.06% of corn starch. In order to determine the substances added to the milk, the detection levels found using official methods were: 0.06% of NaCl, 0.4% of chlorine, 0.25% of starch, 0.06% of acidity neutralizing and 0.4% of water. Furthermore, it was also verified the quality of fluid milk (pasteurized and Ultra High Temperature) sold in the state of Rio de Janeiro. One hundred and thirty-five samples of thirty

WANDERLEY, C. H., et al.

brands of UHT milk and fifteen samples of pasteurized milk were obtained and it was observed that 83.3% (25) samples of UHT milk and 6.66% (1) of pasteurized milk showed compatible values with the quality recommended and considering the limits proposed by the legislation.

**Key words:** milk; fraud; physicochemical analyses.

## INTRODUÇÃO

O leite é o primeiro alimento dos mamíferos no período inicial da vida e as substâncias contidas nessa matriz alimentar fornecem energia e nutrientes necessários para o crescimento (PRATA & PRATA, 2012). Esse alimento apresenta proteínas de alto valor biológico e vitaminas essenciais ao desenvolvimento, contém no mínimo vinte substâncias solúveis em água e quatro vitaminas lipossolúveis, sendo a principal fonte de cálcio entre os alimentos, além de fornecer energia pela presença de lipídios e de lactose (LEMAY; RIJNKELS; GERMAN, 2009).

A composição do leite é complexa e suas características variam conforme a espécie animal. O maior constituinte é a água e de acordo com a espécie ocorrem variações nas quantidades de lipídios, proteínas e carboidratos, os quais são sintetizados na glândula mamária. Pequenas quantidades de minerais e outros constituintes solúveis são provenientes diretamente do plasma sanguíneo (PELLEGRINI et al., 2012).

Pasteurizado e ultra alta temperatura (UAT) são as principais formas de consumo de leite fluido no Brasil (BASTOS et al., 2011; SOARES et al., 2010). Entre os fatores que interferem na qualidade desses produtos, a adição de substâncias estranhas ou fraudulentas apresenta relevância comercial e nutritiva. As fraudes de natureza econômica mais comumente praticadas no leite fluido são adição de água, adição de substâncias neutralizantes da acidez, reconstituíntes da densidade e adição de soro de leite (FILHO et al., 2009). Substâncias reconstituíntes da densidade são frequentemente adicionadas 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 (FILHO et al., 2009). Atualmente, os fraudadores também têm adicionado açúcar e maltodextrina, dosada de forma a restaurar valores analíticos "normais" para certos índices de qualidade física ou química do leite normal (FERRÃO et al., 2007).

As substâncias neutralizantes são adicionadas com objetivo de mascarar a acidez desenvolvida por microrganismos mesofílicos, que desdobram a lactose em ácido láctico e ocasionam a coagulação do leite. A neutralização ilegal da acidez mascara, dessa forma, a qualidade dessa matriz. No caso da adição de conservantes, normalmente são utilizadas substâncias químicas ou outros agentes, os quais exercem ação sobre o desenvolvimento de microrganismos, por retardar a multiplicação. Os conservantes mais utilizados são ácido bórico e seus sais, ácido salicílico e seus sais, água oxigenada, bicromato de potássio, formol, cloro e hipocloritos (TRONCO, 2008).

De acordo com a IN 62 (BRASIL, 2011), não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia na elaboração do leite pasteurizado. Para o leite UAT, o regulamento técnico (BRASIL, 1997) especifica que as únicas substâncias que podem ser adicionadas durante o preparo e utilizadas como adjuvantes de tecnologia são o citrato de sódio, mono, di ou trifosfato de sódio, separados ou em combinação e em quantidade que não seja superior a 0,1g/100 ml.

No Brasil, em outubro de 2007, após denúncias, a Polícia Federal deflagrou a Operação Ouro Branco, onde os envolvidos foram acusados de adicionar ao leite longa vida integral, substâncias

não permitidas ou que excediam a dosagem máxima permitida por lei tornando-o impróprio para consumo, segundo laudo emitido por laboratório vinculado ao Ministério da Agricultura (OCBES, 2010).

Para coibir irregularidades no leite comercializado é necessária a constante avaliação da qualidade desse produto visando a assegurar a saúde coletiva e a evitar a perda econômica. Considerando a relevância do leite na alimentação humana, é de suma importância a avaliação das metodologias empregadas para detecção de fraudes e o aperfeiçoamento dessas técnicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas no mercado varejista do estado do Rio de Janeiro, em um período de seis meses, 135 amostras de leite, sendo 15 marcas de leite pasteurizado e 30 de leite UAT. Em seguida, as amostras foram encaminhadas aos laboratórios para os procedimentos analíticos.

Para verificar a qualidade das marcas comerciais de leite fluido (pasteurizado e UAT) foram realizadas análises oficiais de rotina (AO) (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, pH, densidade relativa a 15°C, ponto de congelamento e álcool/alizarol) e detecção de algumas fraudes específicas (DF) (cloro e hipocloritos, amido, cloretos e neutralizantes da acidez) segundo protocolo analítico descrito nos Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos (Brasil, 2006).

Para avaliar a sensibilidade dos procedimentos analíticos oficiais (AO e DF) foram simuladas as principais adulterações ocorridas no leite com a adição de diferentes percentuais de água, amido, sal (NaCl), bicarbonato de sódio e cloro (Cl), conforme figura 1:

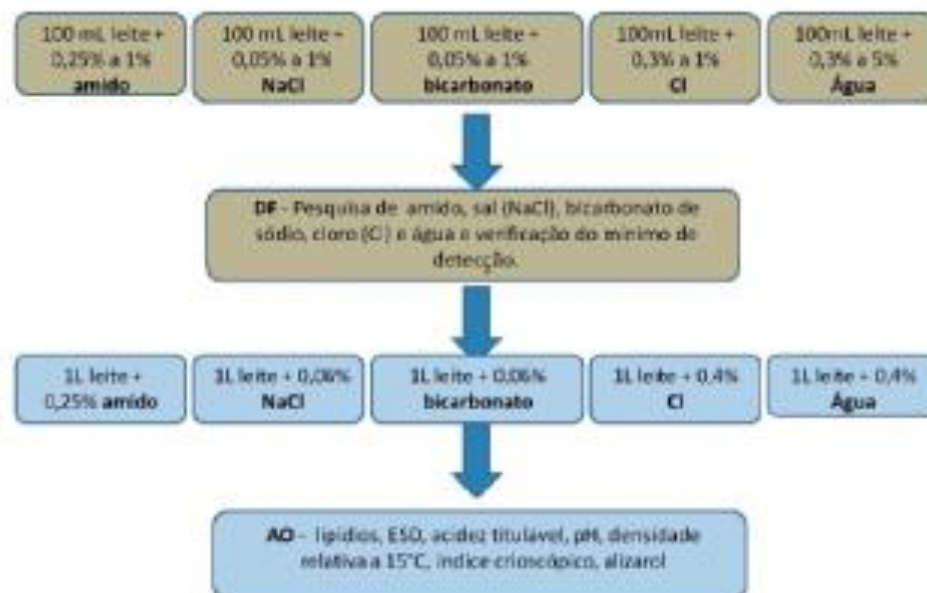


Figura 1 – Desenho experimental dos procedimentos analíticos realizados no leite experimentalmente adulterado com água, bicarbonato, NaCl, cloro e água, antes e após a verificação do limite de detecção

WANDERLEY, C. H., et al.

Foram adicionados, separadamente, em 100 ml de leite, 0,3 a 5% de água ( $H_2O$ ), 0,25% a 1% amido de milho (AM); 0,05% a 1% de NaCl (Sal), 0,05% a 1% de bicarbonato de sódio (BS) e 0,3% a 1% de cloro (Cl).

Depois de verificado o nível mínimo de detecção para cada substância adicionada ao leite, 1 litro de leite foi experimentalmente fraudado com essa concentração mínima, sendo obtidos 5 grupos experimentais (0,4%  $H_2O$  - adição de água; 0,25% AM - adição de amido; 0,06% Sal - adição de sal; 0,06% BS - adição de bicarbonato de sódio e 0,4% Cl - adição de cloro), sendo realizados os procedimentos analíticos oficiais (AO) para o leite fluido (lipídios, ESD, acidez titulável, pH, densidade relativa a 15°C, índice crioscópico, alizarol) com a finalidade de verificar se havia alguma alteração detectável pelos métodos convencionais de rotina.

Foram realizadas seis repetições por procedimento analítico e para cada tipo de substância adicionada ao leite. Os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA two-way) e posterior diferença de média pelo teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5 (versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Verificação da sensibilidade dos métodos analíticos

Após a adição experimental de substâncias ao leite e a execução dos procedimentos analíticos (DF) para verificar a sensibilidade dessas metodologias, foi possível inferir os seguintes limites de detecção: 0,06% de NaCl; 0,4% de cloro; 0,25% de amido, 0,06% de neutralizantes da acidez e 0,4% de água. Pelos resultados observados, as análises de determinação de cloreto de sódio e neutralizantes da acidez foram as mais sensíveis, detectando baixos níveis dessas substâncias. Não existem dados na literatura referentes a essas análises em relação ao limite mínimo de detecção. Os parâmetros físico-químicos que sofreram alguma alteração podem ser visualizados na tabela 1.

FRAUDES EXPERIMENTAIS					
Análises Oficiais	0,06% NaCl	0,4% Cloro	0,25% Amido	0,06% BS*	0,4% Água
Gorduras	N	N	N <sup>o</sup> - coloração	N	N
Acidez	N	N	N	N	N
Densidade	N	N	N	N	N
Crioscopia	0,555 <sup>o</sup> H±0,002 (-0,551 <sup>o</sup> H/- 0,560 <sup>o</sup> H)	0,553 <sup>o</sup> H±0,004 (-0,551 <sup>o</sup> H/- 0,562 <sup>o</sup> H)	N	0,583 <sup>o</sup> H±0,02 (-0,599 <sup>o</sup> H/- 0,617 <sup>o</sup> H)	0,527 <sup>o</sup> H±0,001 (-0,526 <sup>o</sup> H/-0,528 <sup>o</sup> H)
SNG	N	N	N	N	N
Proteína Total	N	N	N	N	N
Alizarol 72%	N	N	N	N	N

Tabela 1 – Alterações observadas pelas análises oficiais após a adição de concentrações mínimas de sal, cloro, amido, neutralizantes da acidez (bicarbonato de sódio) e água.

\*BS= bicarbonato de sódio; SNG = sólidos não gordurosos; N= valores normais

As amostras nas quais foram adicionadas 0,4% de água apresentaram alteração no índice crioscópico ( $-0,527^{\circ}\text{H}\pm 0,001$ ) e diminuição da densidade ( $1,029\pm 0,02$ ) quando comparadas com a amostra controle ( $-0,542\pm 0,03$  e  $1,032\pm 0,04$ , respectivamente). Entretanto, a densidade permaneceu dentro dos limites estipulados pela legislação (1,028 a 1,034) (BRASIL, 2011), sugerindo que a diluição dos componentes do leite pela fraude com 0,4% de água é confirmada pelo ponto de congelamento.

A adição de 0,25% de amido não acarretou alteração em nenhum dos parâmetros normais do leite, demonstrando que, nesta concentração, não é possível a detecção de fraude pelas metodologias oficiais (AO). Uma avaliação sensorial observada nessas amostras e que sugere estudos mais profundos refere-se à coloração da porção lipídica após determinação pelo método butirométrico, que se apresentou mais esbranquiçada e opaca diferindo da tonalidade observada na amostra controle, na qual se apresentou amarelada e translúcida. Esse fato pode estar relacionado à reação das moléculas de glicose geradas pela hidrólise do amido com o aquecimento e da reação com o ácido.

A adição de 0,06% de NaCl acarretou alteração apenas do índice crioscópico, afastando o ponto de congelamento de  $0^{\circ}$  Celsius ( $-0,555^{\circ}\text{H}\pm 0,002$ ).

Nas amostras adulteradas com 0,06% de bicarbonato de sódio observou-se diminuição significativa ( $P<0,05$ ) no ponto de congelamento do leite ( $-0,583^{\circ}\text{H}\pm 0,02$ ) e ligeira diminuição da acidez titulável, que permaneceu dentro do permitido pela instrução normativa nº 62 (BRASIL, 2011), assim como os demais parâmetros.

A adição de 0,4% de cloro ao leite ocasionou a diminuição do ponto de congelamento ( $0,553^{\circ}\text{H}\pm 0,004$ ); no entanto, os demais parâmetros permaneceram normais.

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que a determinação do ponto de congelamento demonstrou ser o procedimento efetivo para constatar possíveis fraudes, seguido de alterações subjetivas nas provas do alizarol.

Cruz e Santos (2008) demonstraram que ao avaliar a densidade é possível identificar a adulteração do leite acima de 10% de sua substituição por água, a de gordura acima de 12%, o EST acima de 8% e o ESD acima de 4%, evidenciando que o procedimento mais adequado deverá ser uma combinação dessas análises.

No presente estudo, observou-se que verificada a acidez titulável entre 14 e 19°D, a prova do alizarol apresentava coloração róseo-salmão, característico de normalidade e abaixo de 14°D, violáceo. Esses dados diferem daqueles descritos por Castro (2005), que observou coloração vermelho-lilás com acidez entre 16°D e 18°D e violeta quando a acidez apresentava valores inferiores a 16°D. Essa divergência pode demonstrar tanto a subjetividade da prova do alizarol, como a subjetividade da percepção da cor.

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2008), o leite só poderá ser condenado caso haja alterações em uma (1) prova de rotina e em uma (1) de precisão ou em pelo menos três (3) análises de rotina. Além disso, ainda segundo esse regulamento, não poderá haver a presença de nenhuma substância que não faça parte de sua composição normal.

WANDERLEY, C. H., et al.

Baseando-se nessa legislação, nas condições deste estado, o leite adulterado nas concentrações mínimas de detecção seria liberado para processamento e consumo, fato que demonstra a relevância do procedimento de crioscopia (ponto de congelamento).

Outro fator a ser avaliado é o percentual de indústrias de laticínios no Brasil que fazem a pesquisa de conservantes e adulterantes no leite. Segundo Dahmer (2006), nesses estabelecimentos localizados no estado do Mato Grosso do Sul, 82,6% e 8,7% das indústrias com Serviço de Inspeção Federal (SIF) realizam pesquisa de conservantes e adulterantes, respectivamente; naquelas com Inspeção Estadual (SIE), 34,9% possuem laboratório de análises físico-químicas e realizam análises básicas de densidade, acidez e alizarol e apenas 6,6% pesquisam a presença de conservantes no leite.

### Pesquisa de fraudes do leite comercializado

As médias e o desvio-padrão encontrados nas análises físico-químicas oficiais do leite pasteurizado e UAT adquiridos no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro podem ser visualizados na tabela 1.

Análises Oficiais (Brasil, 2006)	Leite pasteurizado	Leite UAT
Gordura (g/100 g)	3,11±0,0011 3,0-3,3	3,25±0,002 3,0-3,63
Acidez em g de ácido láctico/100 ml	14,0±2,75 10-18*D	17,4±0,74 16-18*D
Densidade relativa, 15/15°C, g/ml	1,026±0,0041 1,0268-1,032	1,031±0,0019 1,028-1,034
Índice crioscópico	-0,5276°H±0,019 -0,505-0,576°H	-0,518°H±0,070 -0,515-0,605°H
Sólidos não-gordurosos (g/100g)	8,02±0,59 6,99-8,60	8,64±0,44 8,30/9,59
Proteína total (g/100 g)	3,028±0,09 2,90-3,14	3,04±0,25 3,49-2,78
Estabilidade ao alizarol 72 % (v/v)	Alcalinidade (80%) – Estável (100%)	Normal (100%) - Estável (100%)
Substâncias alcalinas	Positivo (53,3%)	Negativo

Tabela 1 - Resultados das médias e desvio-padrão das amostras de leite pasteurizado e UAT adquiridas no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro no período de 6 meses

Considerando as marcas de leite UAT adquiridas no comércio varejista do estado do Rio de Janeiro, 83,3% (25/30) apresentaram resultados analíticos compatíveis com os preconizados pela legislação em vigor (BRASIL, 1997). Apenas cinco (16,6%) marcas apresentaram irregularidades, sendo duas (6,6%) por aguagem, com valores do ponto de congelamento acima do permitido pela legislação (superior a -0,530°H), duas (6,6%) por adição de substâncias alcalinas e uma (3,3%) amostra com diminuição acentuada do ponto de congelamento (inferior a -0,550°H), sugerindo a adição de alguma substância reconstituente ou álcool.

Em contrapartida, 93,3% (14/15) das amostras de leite pasteurizado apresentaram alguma irregularidade relacionada à qualidade e/ou a fraudes, caracterizando um perfil de qualidade

indesejável deste tipo de leite. As irregularidades no leite pasteurizado encontradas foram: diminuição na acidez titulável (53,3%), aumento do índice crioscópico (86,6%), diminuição do índice crioscópico (0,3%), alcalinidade na prova do alizarol (80%), presença de substâncias alcalinizantes (53,3%), diminuição do extrato seco desengordurado (40%) e diminuição da densidade (80%).

Em nenhuma das amostras foi verificada a presença de cloretos e de cloro, alterações no teor de gordura ou instabilidade proteica.

A fraude mais frequentemente observada foi a adição de água ou de outra substância que ocasionou a diminuição dos sólidos totais, corroborando os dados relatados por vários autores (BORGES; PINTO, 2007; CRUZ; SANTOS, 2008; PINA et al., 2007; SILVA et al., 2008). Esse tipo de fraude, na maioria das vezes, ocasiona alteração nas provas de álcool/alizarol e de acidez titulável devido, provavelmente, à diluição das substâncias ácidas presentes normalmente no leite, ao aumento do ponto de congelamento ( $> -0,530^{\circ}\text{H}$ ), à diminuição da densidade ( $< 1,028$ ) e do ESD ( $< 8,4\%$ ). Em alguns casos, mesmo sendo detectada aguagem pelo crioscópio eletrônico, a densidade, o ESD e a acidez titulável apresentavam-se dentro dos parâmetros de normalidade.

Após a fraude por aguagem, a adição de substâncias alcalinas foi a mais encontrada. A presença de substâncias alcalinas foi, na maioria das vezes, detectada pela prova do alizarol. Os demais procedimentos analíticos oficiais foram ineficientes na sua detecção. A fraude somente foi confirmada na pesquisa de substâncias neutralizantes, utilizando-se o reagente ácido rosólico.

Alguns trabalhos também têm demonstrado a existência de fraudes em leite fluido em outros estados do Brasil (BORGES; PINTO, 2007; DAHMER, 2006; MARTINS et al., 2011a; MARTINS, 2011b; SILVA, 2008), indicando que uma grande quantidade do leite produzido possui algum tipo de adulteração. Nesse contexto, devem ser desenvolvidas novas metodologias que minimizem a fraude já disseminada em nosso país.

## CONCLUSÃO

A qualidade do leite pasteurizado comercializado no estado do Rio de Janeiro está comprometida e precisa ser melhorada com base nos sistemas de fiscalização vigente.

As análises oficiais de rotina (AO) não foram eficazes na detecção de irregularidades no leite. Portanto, sempre que houver alteração em algum resultado nas análises oficiais, a indústria de leite ou a indústria de laticínio deverá realizar análises complementares de substâncias neutralizantes da acidez, conservantes e reconstituíntes da densidade, ainda que nas outras provas os resultados estejam dentro dos parâmetros permitidos pela legislação, a fim de evitar que leite impróprio para consumo seja comercializado e consumido pela população.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação (PROPP) da Universidade Federal Fluminense pelo apoio financeiro concedido através do Programa Jovem Pesquisador.



WANDERLEY, C. H., et al.

## NOTAS

<sup>1</sup>Aluna de Graduação – UFF. Rua Vital Brasil Filho, nº 64 – Santa Rosa, Niterói/RJ, 24320-340.

<sup>2</sup>Prof. Adjunto. Área de Leite e Derivados Lácteos - MTA/UFF. Rua Vital Brasil Filho, nº 64 – Santa Rosa, Niterói/RJ, 24320-340. E-mail:adrianaoliveira@id.uff.br.

<sup>3</sup>Aluna de Iniciação Científica – UFPR. Rua Pioneiro, nº 2153 – Palotina/PR, 85950-000.

<sup>4</sup>Prof. Adjunto. Área de Controle Físico-Químico de POA – MTA/UFF. Rua Vital Brasil Filho, nº 64 – Santa Rosa, Niterói/RJ, 24320-340.

## REFERÊNCIAS

BASTOS et al. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. *Caderno de Saúde Coletiva*, n. 1, v. 19, p. 51-60, 2011.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, alterado pela Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT. Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 8, 14 dezembro de 2006. Seção I.

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: 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2007, Gramado. *Trabalhos do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2007*.

CASTRO, P. S. Tecnologia de Leite e Derivados. Universidade Católica de Goiás. Departamento de Matemática e Física. Curso de Engenharia de Alimentos. Apostila de Aulas Práticas – MAP 3340. Fevereiro de 2005.

CRUZ, E. N.; SANTOS, E. P. Aguagem do leite: métodos básicos de identificação. XI Encontro de Iniciação à Docência. Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias/Departamento de Tecnologia Rural/MONITORIA. UFPA-PPG. 2008.

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

FERRÃO et al. LS-SVM: Uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada.

Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Química Nova*, n. 4, v. 30, p. 852-859, 2007.

FILHO et al. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns – PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, n. 2, v. 3, p. 38-46, 2009.

LEMAY, D.G.; RIJNKELS, M.; GERMANY, J.B. Lessons from the bovine genome: Implications for human nutrition and research. *The Journal of Nutrition*, p. 1271-1272, 2009.

MARTINS, P.C. A hora e a vez do leite de qualidade. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/>>. Acesso em 25 out. 2011a.

MARTINS, F.O. Avaliação da composição, da qualidade físico-química e ocorrência de adulterações em leite UHT. Disponível em: <<http://www.terraviva.com.br/IICBQL/p043.pdf>>. Acesso em 25 ago. 2011b.

OCB/ES SESCOOP/ES. Fraude em Leite UHT, o famoso leite Longa-Vida. Disponível em: [http://www.ocbes.coop.br/ocb/index.php?module=m\\_noticias&pag=inf\\_noticia&cid\\_noticia=1174](http://www.ocbes.coop.br/ocb/index.php?module=m_noticias&pag=inf_noticia&cid_noticia=1174). Acesso em 04 out. 2010.

PINA, M. S. L. et al. Técnicas experimentais para identificação de substâncias estranhas presentes no leite de vaca comercializado em Garanhuns. I Congresso Norte-Nordeste de Química, Anais, Natal, 2007.

PELLEGRINI et. al. Características físico-químicas de leite bovino, caprino e ovino. *Synergismus Scientifica*, n. 1, v. 7, 2012.

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*, n. 2, v. 17, p. 29-39, 2012.

SOARES et al. Hábitos de consumo de leite em três municípios do estado do Rio Grande do Norte. *Revista Verde*. n. 3, v. 5, p. 160-164, 2010.

SILVA, M. C. D., et al. 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.

TRONCO, V.M. Pesquisa de substâncias estranhas ou fraudulentas. *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. Santa Maria: Editora UFSM, 2003. cap. 5, p. 130-140.

6.1 CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO INTITULADO: Detection of adulteration in goat and sheep milk with cow milk by SDS-Page electrophoresis and its relationship with physicochemical parameters of quality

O presente artigo será enviado para submissão para a revista Journal of Dairy Science no dia 24/02/2014.