



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALIA GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
A DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE LEITE POR ADIÇÃO
DE SORO DE QUEIJO UTILIZANDO HPLC-PDA**

Londrina
2021

NATALIA GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
A DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE LEITE POR ADIÇÃO
DE SORO DE QUEIJO UTILIZANDO HPLC-PDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof. Dr^a. Vanerli Beloti

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Gonzaga, Natalia.

Desenvolvimento de metodologia analítica para a detecção de adulteração de leite por adição de soro de queijo utilizando HPLC-PDA. / Natalia Gonzaga. - Londrina, 2021.
96 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Desenvolvimento e validação de metodologia para detecção de conservantes em leite - Tese. 2. Método alternativa para a identificação de leite adulterado com soro de queijo - Tese. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

NATALIA GONZAGA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE LEITE POR ADIÇÃO DE SORO
DE QUEIJO UTILIZANDO HPLC-PDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

.....Á

Prof. Orientadora: Dr^a. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

.....Á

Prof. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina - UEL

.....Á

Dr. Ronaldo Tamanini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

.....Á

Prof. Dr^a. Lucienne Garcia Pretto Giordano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

.....Á

Prof. Dr. Éder Paulo Fagan
Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP

Londrina, 18 de outubro de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela vida e pelas oportunidades grandiosas.

À Prof. Dr^a. Vanerli Beloti, minha querida orientadora, que por tantos anos me acompanhou, sempre dividindo seus valiosos conhecimentos e experiências. Obrigada por tanta dedicação, você fez toda a diferença na minha caminhada profissional.

Ao Dr. Ronaldo Tamanini, por sempre estar disposto a ajudar em todos os momentos em que precisei por tantos anos, e pelas valiosas colaborações neste trabalho.

À Prof. Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf, que acompanha minha caminhada há tempos, agradeço imensamente pela disposição em dividir seus conhecimentos. Obrigada por sempre abrir as portas de seu laboratório para mim.

À Prof. Dr^a. Lucienne Garcia Pretto Giordano, pela disposição em dividir seus conhecimentos e colaborar com este trabalho e por todos os conselhos e ajuda sempre que precisei, desde os tempos como residente até hoje.

Ao Prof. Dr. Éder Paulo Fagan, que foi quem me apresentou o universo da inspeção de leite, muito obrigada por suas importantes colaborações neste trabalho.

Ao Dr. Lycio Shinji Watanabe, meu colega de caminhada científica, por dividir todo seu conhecimento, pela boa vontade em ajudar sempre e pela essencial colaboração neste trabalho.

À Dr^a. Juliana Mareze, minha querida amiga, por dividir comigo todas as lutas. Obrigada pela colaboração nos trabalhos e também por todo o apoio emocional e amizade.

Aos colegas que passaram pelo LIPOA durante todo esse tempo, dividir conhecimentos e experiências é fundamental para a evolução de todos nós.

Ao curso de pós-graduação em Ciência Animal da UEL e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço aos meus pais Silvana e Mateus, querida irmã Ana Julia, tia Cíntia, avó Anézia e toda família pelo apoio e por acreditarem em mim. Ao Pedro, meu companheiro de vida, que esteve ao meu lado nesses anos, dando força para que eu passasse por todos os momentos desafiadores de forma mais leve.

GONZAGA, Natalia. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a detecção de adulteração de leite por adição de soro de queijo utilizando HPLC-PDA**. 2021. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O leite é um dos principais alimentos alvos de adulterações. O soro de leite por ser resultante da fabricação de queijos e consistir em um subproduto barato é muitas vezes adicionado ao leite para aumentar seu volume. Esta é uma fraude economicamente atraente, visto que o soro é um produto frequentemente excedente na indústria de laticínios, que não pode ser descartado diretamente no meio ambiente, apresentando complexidade na detecção de sua mistura, pela similaridade de composição química com o leite. O método tradicional para identificar a fraude por adição de soro de queijo em leite emprega a detecção do caseinomacropéptido (CMP), um composto específico do soro, determinado pela cromatografia líquida com coluna de exclusão. Porém, um produto semelhante ao CMP, conhecido como pseudo-CMP, pode ser formado no leite líquido, devido à ação de proteases produzidas por microrganismos psicrótróficos, podendo ocasionar resultados falso-positivos pela coeluição destes analitos, exigindo o uso da espectrometria de massas. Buscando uma alternativa para a detecção segura da adição de soro ao leite, este trabalho propõe desenvolver e validar um novo método simples, que envolva a extração e quantificação dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio no leite, presentes nos coagulantes que são utilizados na fabricação do queijo, e que acabam por deixarem resíduos no soro. Por esta abordagem, tanto o benzoato de sódio como o sorbato de potássio poderiam ser utilizados como potenciais marcadores para a detecção da fraude por adição de soro de queijo ao leite. No método proposto a etapa de extração consiste apenas na diluição da amostra em acetonitrila (1:1 v/v) seguida de centrifugação, sendo o sobrenadante filtrado em membrana de PTFE 0,22 μm e injetado em um cromatógrafo à líquido com coluna de fase reversa e detecção de arranjo de diodos (HPLC-PDA). Após a validação, realizada de acordo com as normas da ANVISA/ICH, foram analisadas 30 amostras de soro de queijo, sendo 11 obtidas da produção em laboratório e 19 amostras provenientes de queijarias comerciais e artesanais. Todas as amostras de soro foram analisadas puras e diluídas em leite cru em 50%, 20%, 10%, 5% e 1%. Também aferiu-se o índice crioscópico, pH e detecção/quantificação dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio por HPLC-PDA. Não foi possível detectar a fraude com adição de 10% de soro de queijo no leite através das análises de índice crioscópico e pH, levando-se em conta que os valores médios foram de $-0,546^{\circ}\text{H}$ e 6,80, considerados normais para o leite. Por outro lado, o método desenvolvido e validado mostrou-se eficiente na separação e detecção simultânea do benzoato de sódio e sorbato de potássio nas amostras de leite experimentalmente fraudadas, demonstrando baixos limites de detecção e quantificação, respectivamente de 0,204 e 0,618 mg L^{-1} e 0,108 e 0,328 mg L^{-1} , com exatidão entre 92,67 e 99,53%, sendo o pH 4,0 o selecionado como o mais adequado para continuidade do estudo. Detectou-se o benzoato de sódio em 93,10% das amostras de soro avaliadas por HPLC-PAD, sendo que em três delas também se encontrou o sorbato de potássio. Conclui-se que a abordagem proposta representa uma alternativa viável, aplicável ao controle de

qualidade, para a detecção confiável de adulterações desta natureza, cuja adição do soro de queijo em leite, geralmente é feita em uma proporção maior do que 10%.

Palavras-chave: caseinomacropéptido; benzoato de sódio; sorbato de potássio; soro de queijo; fraude.

GONZAGA, Natalia. **Development of analytical methodology for the detection of milk adulteration by addition of cheese whey using HPLC-PDA**. 2021. 100 p. Thesis (Doctorate's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Milk is one of the main foods targeted for adulteration. Because whey is made from cheese making and is a cheap by-product, it is often added to milk to increase its volume. This is an economically attractive fraud, since whey is a frequently surplus product in the dairy industry, which cannot be directly discarded into the environment, presenting complexity in detecting its mixture, due to the similarity of chemical composition with milk. The traditional method to identify fraud by adding cheese whey to milk employs the detection of caseinomacropeptide (CMP), a specific compound in whey, determined by liquid chromatography with an exclusion column. However, a product similar to CMP, known as pseudo-CMP, can be formed in liquid milk, due to the action of proteases produced by psychrotrophic microorganisms, which can cause false-positive results due to the co-elution of these analytes, requiring the use of mass spectrometry. Seeking an alternative for the safe detection of the addition of whey to milk, this work proposes to develop and validate a new simple method, which involves the extraction and quantification of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in milk, present in coagulants that are used in milk manufacture of the cheese, and which end up remaining, in an excess, in the whey. By this approach, both sodium benzoate and potassium sorbate could be used as potential markers for fraud detection by adding cheese whey to milk. In the proposed method, the extraction step consists only of diluting the sample in acetonitrile (1:1 v/v) followed by centrifugation, with the supernatant being filtered on a 0.22 µm PTFE membrane and injected into a liquid chromatograph with a phase column reverse and diode array detection (HPLC-PDA). After validation, carried out in accordance with ANVISA/ICH standards, 30 samples of cheese whey were analyzed, 11 of which were obtained from laboratory production and 19 samples from commercial and artisanal cheese factories. The tests performed were cryoscopic index, pH and detection/quantitation of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives by HPLC-PDA. All whey samples were analyzed pure and diluted in raw milk at 50%, 20%, 10%, 5% and 1%. It was not possible to detect fraud with the addition of 10% cheese whey in milk through the cryoscopic index and pH analyses, taking into account that the mean values were -0.546°H and 6.80, considered normal for milk. On the other hand, the developed and validated method proved to be efficient in the separation and simultaneous detection of sodium benzoate and potassium sorbate in experimentally defrauded milk samples, demonstrating low detection and quantification limits, respectively 0.204 and 0.618 mg L⁻¹ and 0.108 and 0.328 mg L⁻¹, with accuracy between 92.67 and 99.53%, with pH 4.0 being selected as the most suitable for the continuation of the study. Sodium benzoate was detected in 93.10% of the whey samples evaluated by HPLC-PAD, and in three of them potassium sorbate was also found. It is concluded that the proposed approach represents a viable alternative, applicable to quality control, for the reliable detection of adulterations of this nature, whose addition of cheese whey in milk is generally made in a proportion greater than 10%.

Key-words: caseinmacropeptide; sodium benzoate; potassium sorbate; whey; fraud.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figura 1** – Seletividade e especificidade do método cromatográfico HPLC-PDA para detecção do benzoato de sódio e sorbato de potássio em leite, empregando o leite cru sem adição de padrão como o branco analítico e com a adição de outros possíveis interferentes como ácido láctico, acético, ascórbico, cítrico e málico, nos comprimentos de ondas máximos de absorvância **(a)** 225 nm e **(b)** 255 nm. Espectro de varredura do **(c)** benzoato de sódio com comprimento de onda $\lambda_{max} = 225$ nm e **(d)** sorbato de potássio com comprimento de onda $\lambda_{max} = 255$ nm51
- Figura 2** – **(a)** Linearidade e **(b)** curvas analíticas e faixa de trabalho do método desenvolvido para os padrões dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em leite cru. (c) Gráfico de resíduos do benzoato de sódio e (d) gráfico de resíduos do sorbato de potássio.....53
- Figura 3** – Cromatogramas do método proposto avaliando-se a robustez pela variação em distintas proporções na composição da fase móvel (acetonitrila(ACN): tampão fosfato(TP) em pH 4.0) para amostra de leite com adição dos padrões de benzoato de sódio e sorbato de potássio a 5 mg L^{-1} no comprimento de onda de 225 nm **(a)**; em 255 nm **(b)**; e cromatogramas da avaliação da robustez do método cromatográfico com relação à variação da temperatura da coluna para amostra de leite com adição dos padrões de benzoato de sódio e sorbato de potássio a $10,00 \text{ mg L}^{-1}$ em 225 e 255 nm **(c)**.56
- Figura 4** – Separação cromatográfica em função do pH da fase móvel para os conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio a 5 mg L^{-1}58

ARTIGO B

- Figura 1** – Gráfico dos índices crioscópicos ($^{\circ}\text{H}$) de 30 amostras analisadas de soro de queijo e de leite adulteradas com soro nas proporções 50%, 20%, 10%, 5% e 1% 72

- Figura 2** – Resultados do pH para as 30 amostras analisadas de soro de queijo e de leite adulteradas com soro nas proporções de 50%, 20%, 10%, 5% e 1%, com destaque para o intervalo de especificação de pH para o leite com os valores mínimos e máximos delimitado pelas linhas vermelhas (6,4 - 6,8) 73
- Figura 3** – Cromatogramas das análises por HPLC-PDA de amostras de leite cru, do coagulante utilizado na produção do queijo e do soro do queijo fabricado com o uso deste mesmo coagulante..... 75
- Figura 4** – Cromatogramas de análises por HPLC-PDA nos comprimentos de onda de 225 nm e 255 nm de amostras de água, leite cru, padrões diluídos em leite contendo os dois conservantes - benzoato de sódio e sorbato de potássio (5 mg L⁻¹) e do soro de queijo..... 76
- Figura 5** – Cromatograma de amostras de leite cru contendo diferentes porcentagens adicionadas de soro de queijo 77
- Figura 6** – Quantificação de benzoato de sódio nas 30 amostras de soro de queijo e amostras de leite experimentalmente fraudadas, com os respectivos soros, nas proporções de 100% soro, 50% soro, 20% soro, 10% soro, 5% soro e 1% soro. **(a)** Quantificação até 70,00 mg L⁻¹. **(b)** Quantificação até 10,00 mg L⁻¹ 78
- Figura 7** – Cromatograma dos perfis dos soros de queijo de amostras analisadas, juntamente de amostras de leite cru, amostra de leite experimentalmente adulterada com benzoato de sódio e amostra de leite experimentalmente adulterada com sorbato de potássio em **(a)** 225nm e **(b)** 255 nm 79

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Validação dos dados do método de extração e determinação proposto por HPLC-RID de carboidratos em leite bovino (n = 3)54
- Tabela 2** – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de benzoato de sódio e sorbato de potássio por método cromatográfico54
- Tabela 3** – Robustez do método cromatográfico para detecção dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio quanto às variações de proporção de fase móvel e temperatura de forno55

ARTIGO B

- Tabela 1** – Quantificação do sorbato de potássio pelo método proposto por HPLC-PDA em três amostras de soro de queijo que apresentaram este conservante80

LISTA DE QUADROS

ARTIGO A

Quadro 1 – Comparativo, em relação aos reagentes, equipamentos, processos e tempo de duração, entre o método proposto e o método oficial para a quantificação de conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio empregando HPLC	59
--	----

ARTIGO B

Quadro 1 – Volume de coagulante, de acordo com instruções do fabricante, utilizado na produção experimental do queijo para a obtenção do soro	70
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMP	Caseinomarcropeptídeo
DP _o	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
Eq	Equação
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GMP	Glicomacropeptídeo
IC	Inclinação da Curva
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IN	Instrução Normativa
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS	Espectrometria de massa
MIR	Espectroscopia por Infravermelho Médio
nm	nanômetro
NIR	Espectroscopia por Infravermelho Próximo
PDA	Detector de Arranjo de Diodos
CMP	Caseinomarcropeptídeo
rpm	Rotação por minuto
TR	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume

°H	grau Hortvet
°D	grau Dornic
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ADULTERAÇÕES NO LEITE	16
2.1.1	Principais Adulterações Praticadas no Leite	18
2.2	ADULTERAÇÕES ECONOMICAMENTE MOTIVADAS	19
2.2.1	Fraude por Adição de Soro de Queijo	21
2.2.2	Composição e Características do Soro de Queijo	22
2.2.3	Caseinomacropéptido (CMP).....	23
2.2.3.1	Pseudo-caseinomacropéptido.....	24
2.2.4	Processo de Coagulação e Formação do Caseinomacropéptido	25
2.2.5	Métodos de Detecção de Soro de Queijo no Leite	26
2.3	LEGISLAÇÃO PARA DETECÇÃO DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO	30
2.4	NOVO MÉTODO PARA DETECÇÃO DE SORO DE QUEIJO NO LEITE.....	30
2.4.1	Desenvolvimento de Novo Método Analítico	30
2.4.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE ou HPLC	31
2.4.3	Substâncias Residuais no Soro de Queijo	33
2.4.3.1	Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio.....	33
	REFERÊNCIAS	35
3.	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	ARTIGO A – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE CONSERVANTES EM LEITE POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA	44
5	ARTIGO B – MÉTODO ALTERNATIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE LEITE ADULTERADO COM SORO DE QUEIJO, PELA DETECÇÃO DE CONSERVANTES DO COAGULANTE	64

6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
----------	-----------------------------------	-----------

	APÊNDICES	91
--	------------------------	-----------

	APÊNDICE A – Tabelas contendo os resultados dos testes de crioscopia, pH e quantificação do benzoato de sódio	92
--	---	-----------

1 1 INTRODUÇÃO

2 Um dos principais alimentos alvos de adulterações é o leite, sendo
3 este um dos principais problemas para a indústria de laticínios e órgãos de inspeção
4 de alimentos (Santos, Pereira-filho, & Colnago, 2016). As fraudes consistem em criar
5 oportunidades de driblar o sistema de controle de qualidade, podendo ocorrer em
6 qualquer momento da cadeia de produção, até mesmo dentro de uma planta
7 industrial (Spink et al., 2017). Alguns casos de fraude alimentar podem causar danos
8 importantes, sendo o risco à saúde pública um problema grave e muitas vezes de
9 difícil detecção (Tähkää et al., 2015). A fraude pode ser realizada pela própria
10 indústria em casos mais sofisticados, pelo responsável pela coleta do leite nas
11 propriedades ou ainda pelos produtores (Beloti, 2015).

12 As três principais finalidades que motivam a adulteração do leite
13 são: aumentar o volume, conservar o leite e mascarar a sua acidez, sendo essas
14 práticas proibidas por lei (Brasil, 2018). A fraude por adição de água ou água mais
15 reconstituintes, tem o intuito de aumentar o volume do leite e disfarçar a sua adição.
16 A adição de conservantes no leite tem a finalidade de aumentar a vida útil do
17 produto, pois estes atuam como bactericidas ou bacteriostáticos, realizando
18 eliminação ou controle do crescimento microbiano no leite. Já a adição de
19 neutralizantes de acidez tem como finalidade mascarar a alta acidez causada pelo
20 elevado número de microrganismos presentes, decorrentes muitas vezes de má
21 higiene na ordenha e no armazenamento ou refrigeração insuficiente (Beloti, 2015).

22 Com o intuito de aumentar a receita sobre determinado alimento, é
23 praticada a adulteração economicamente motivada, que resulta da diluição, adição
24 ou substituição intencional em matérias primas ou produtos prontos para o consumo
25 (Cavin et al., 2018). No caso do leite, o soro obtido na fabricação de queijos, é um
26 subproduto barato, e é adicionado ao leite de forma fraudulenta, para aumentar seu
27 volume (Nascimento et al., 2017). Esta é uma fraude economicamente atrativa para
28 praticantes de adulterações no leite, visto que é um produto frequentemente
29 excedente na indústria de laticínios (Recio & Lo, 1996).

30 O método tradicional utilizado na identificação de fraude por adição
31 de soro de queijo em leite dá-se pela detecção do caseinomacropéptido (CMP), um
32 composto específico presente apenas no soro e não no leite. De acordo com o
33 Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, o método

1 oficial para a detecção e quantificação de CMP é feito por meio da cromatografia
2 líquida de alta eficiência (CLAE do inglês HPLC) (Brasil, 2019). Porém, um produto
3 semelhante à CMP, conhecido como pseudo CMP, pode ser formado no leite líquido
4 devido à ação de proteases produzidas por microrganismos psicrotóxicos (Noni &
5 Resmini, 2005), podendo ocasionar resultados falso-positivos, já que os métodos
6 cromatográficos, apresentam coeluição para substâncias semelhantes, como CMP
7 e pseudo-CMP, que diferem em apenas um aminoácido (Bremer et al., 2008).

8 Inúmeros métodos para a detecção de diferentes adulterantes são
9 descritos na literatura. Porém, a temática necessita de técnicas muito confiáveis e
10 sensíveis, pois a fraude vai além de aspectos econômicos, como também é uma
11 questão importante de ética e saúde (Das et al., 2011). As técnicas cromatográficas
12 são muito utilizadas na caracterização e autenticação de alimentos, visto que
13 proporcionam alta sensibilidade, reprodutibilidade e robustez, permitindo obter sinais
14 analíticos com alto conteúdo de informação (Esteki et al., 2018), medindo
15 simultaneamente vários compostos em uma única análise. Essa ferramenta é muito
16 importante para a determinação da autenticidade do leite e derivados (Kamal &
17 Karoui, 2015).

18 A composição do soro é semelhante à do leite, exceto pela quase
19 ausência de caseína, que fica no queijo. As características físico-químicas do soro
20 de queijo e do leite também são muito parecidas, o que torna a detecção desta
21 adulteração muito complexa, sendo fundamental o desenvolvimento de análises
22 simples, rápidas e precisas para a detecção do soro de queijo no leite (Vieira et al.,
23 2015). A autenticidade dos alimentos tem se tornado um ponto muito importante
24 para os consumidores atuais, tornando o controle de qualidade dentro da indústria
25 uma indispensável ferramenta.

26 A procura por um método confiável, indica que o HPLC é uma
27 ferramenta que pode ser muito útil nessa tarefa, no entanto, é preciso que se busque
28 outro princípio, diferente do CMP, na detecção da fraude por adição de soro de
29 queijo em leite, para que se elimine a possibilidade de falso positivos. Assim, esse
30 estudo se propõe a buscar marcadores alternativos ao CMP que indiquem com
31 segurança a fraude por adição de soro empregando HPLC-PDA com fase reversa.

1 2 REVISÃO DE LITERATURA

2 2.1 ADULTERAÇÕES NO LEITE

3 O leite é um dos alimentos mais vulneráveis à adulteração
4 fraudulenta, sendo este um dos principais problemas da indústria de laticínios
5 (Santos, Pereira-filho, & Colnago, 2016; Tsimidou et al., 2016), bem como dos
6 serviços responsáveis pela inspeção desse alimento. A fraude pode causar uma
7 série de implicações, além das questões econômicas, pode acarretar enormes
8 riscos à saúde pública (Sharma & Paradakar, 2010; Tähkää et al., 2015;
9 Nascimento et al., 2017; Abbas et al., 2018), e também ocasionar a perda de
10 confiança na marca e produto por parte dos consumidores. Moore, Spink, & Lipp
11 (2012), em sua revisão sobre os alimentos mais envolvidos em casos de fraude
12 alimentar no mundo, encontraram o leite entre os sete alimentos mais vulneráveis ao
13 crime, incluindo azeite de oliva, mel, açafrão, suco de laranja, café e suco de maçã.
14 Já Tsimidou et al. (2016), estudando alimentos adulterados nos Estados Unidos,
15 encontraram o leite e seus derivados como o segundo lugar no ranking de alimentos
16 mais adulterados, perdendo apenas para peixes e frutos do mar.

17 Muitos casos de contaminações ou adulterações em alimentos
18 ocorreram em diversos países nos últimos anos, como exemplos famosos a adição
19 de melamina ao leite em pó na China, responsável por inúmeras mortes (Qin, Chao,
20 & Kim, 2013; Tsimidou et al., 2016; Peng et al., 2017), e a adulteração de carne
21 bovina com carne equina na Europa (Tsimidou et al., 2016; Peng et al., 2017).
22 Incidentes como esses geram grande impacto, ocasionando preocupações com a
23 saúde pública e perdas econômicas significativas.

24 As atenções estando voltadas para sistemas e programas
25 tradicionais de segurança de alimentos, podem tornar-se ineficientes para a
26 abordagem da adulteração alimentar (Spink et al., 2017). As falsificações também
27 podem estar mais presentes em produtos com valores mais baixos, em que a
28 expectativa de qualidade não é a mesma do que a de um produto com maior preço
29 (Huck, Pezzei, & Huck-pezzei, 2016), não justificando, este fato, a total segurança
30 que os alimentos devem ter, independentemente do valor atribuído.

31 O que geralmente caracteriza a fraude é o não cumprimento das

1 leis alimentares, enganar o consumidor e a fraude economicamente motivada (Esteki
2 et al., 2018). A prática de adulteração ou substituição de produtos alimentares é
3 cada vez mais comum e evidenciada por diversos incidentes envolvendo alimentos.
4 A otimização da segurança alimentar e a melhoria na garantia de qualidade, através
5 da implementação de testes rápidos por agências reguladoras, reduziria o perigo
6 crescente para consumidores de produtos adulterados (Rodriguez-Saona, Giusti &
7 Shotts, 2016).

8 Os fabricantes de alimentos possuem obrigações relacionadas aos
9 sistemas de controle de qualidade e segurança dos alimentos e devem garantir a
10 identificação e gerenciamento adequados. O Programa de Análise de Perigos e
11 Pontos Críticos de Controle (APPCC) é uma ferramenta eficaz no que diz respeito a
12 contaminações acidentais em alimentos. Porém, há que se considerar que, muitas
13 vezes, é a própria indústria a responsável pela fraude. O que torna este programa
14 igualmente alvo de fraudes. Raramente algum processo garantirá que alimentos e
15 seus suprimentos não sejam alvo de adulterações (Stadler et al., 2016).

16 Seguir regulamentações alimentares pode gerar altos custos para
17 as indústrias. Porém, deixar de seguir essas regras pode gerar riscos à saúde
18 pública, além de ludibriar os consumidores que confiam que o alimento foi produzido
19 seguindo tais regulamentos (Tähkää et al., 2015). No entanto, as indústrias
20 podem se beneficiar ao seguir as regras, entregando um produto saudável,
21 fidelizando clientes e evitando escândalos por envolvimento em casos de fraude.

22 Quando o controle de qualidade é ineficiente, as adulterações
23 podem tornar-se sistemáticas, pois o comportamento oportunista dos criminosos não
24 sofre medidas de punição. Inúmeros casos de adulterações em alimentos deixam de
25 ser detectados e relatados. Geralmente a adulteração de um alimento é realizada
26 fora dos sistemas conhecidos e confiáveis para o controle de qualidade, os
27 criminosos criam uma oportunidade de fraudar, descobrindo maneiras de ludibriar o
28 sistema (Spink et al., 2017). O envolvimento de criminosos em adulterações
29 alimentares pode dizer respeito à fragilidade do controle de qualidade da cadeia
30 alimentar e das autoridades (Tsimidou et al., 2016).

31 Com os diversos casos sobre adulterações em alimentos, para os
32 consumidores, as informações divulgadas por órgãos públicos podem oferecer maior
33 confiança do que às fornecidas pela indústria (Huck, Pezzei, & Huck-pezzei, 2016).
34 As gerações de consumidores, em um futuro próximo, tendem a ser mais informadas

1 e conscientes, exigindo alimentos íntegros e saudáveis, exigindo sustentabilidade e
2 bem-estar animal (Medina et al., 2019). A autenticidade dos alimentos tem se
3 tornado muito importante para os consumidores atuais, tornando o controle de
4 qualidade dentro da indústria uma indispensável ferramenta. No entanto, muitas
5 indústrias se valem da dificuldade encontrada na detecção de determinadas fraudes,
6 para praticá-las, sendo esse o caso da adição de soro de queijo ao leite.

7 2.1.1 Principais Adulterações Praticadas no Leite

8 A fraude pode ser realizada em qualquer ponto da cadeia do
9 alimento, pela própria indústria, em casos mais sofisticados, ou pelo responsável
10 pela coleta do leite nas propriedades, ou mesmo pelos produtores (Beloti, 2015).
11 Diversos tipos de adulterações são praticados no leite e seus derivados, todas de
12 cunho criminoso, pois, segundo a legislação em vigor, o leite não deve apresentar
13 substâncias estranhas à sua composição, tais como agentes inibidores do
14 crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e reconstituintes da densidade ou
15 do índice crioscópico (Brasil, 2018).

16 Diversos alimentos são frequentemente adulterados com a
17 intenção de produzir um aumento de volume, controlar a contaminação e disfarçar a
18 deterioração dos produtos, representando uma enorme preocupação tanto para os
19 órgãos de fiscalização quanto para os consumidores (Medina et al., 2019). O
20 exemplo mais simples de adulteração do leite é o aumento de volume por adição de
21 água também denominada de aguagem (Tsimidou et al., 2016; Nascimento et al.,
22 2017). Porém, a fraude do leite pode ir além, envolvendo a diluição e/ou adição de
23 substâncias de baixo custo, com baixa qualidade e muitas vezes prejudiciais para a
24 saúde de quem as consome (Nascimento et al., 2017). A fraude por adição de água
25 proporciona maior lucro (Beloti, 2015), no entanto é de fácil detecção e, por isso está
26 frequentemente associada à adição de substâncias que recuperem a densidade ou o
27 ponto de congelamento do leite, de forma a burlar os sistemas de controle de
28 qualidade.

29 Outro crime muito comum na cadeia do leite, tem como objetivo o
30 aumento da sua vida útil, adicionando substâncias que reduzem ou impedem o
31 crescimento microbiano, incluindo produtos como peróxido de hidrogênio,
32 formaldeído, hipoclorito, ácido salicílico, dicromato de potássio (Nascimento et al.,

1 2017), ácido cianúrico e melamina (Draher et al., 2016). Alguns desses compostos
2 proibidos são adicionados aos alimentos, podendo colocar em grave risco a saúde
3 da população exposta (Jia et al., 2014), já que muitas destas substâncias tem
4 potenciais toxigênicos e cancerígenos.

5 Alguns contaminantes comumente utilizados de forma fraudulenta
6 como reconstituintes de densidade, após a adição de água, são o amido, a
7 sacarose, a maltodextrina, o cloreto de sódio e o álcool (Karthek et al., 2011). Outro
8 reconstituente amplamente utilizado é a ureia, que além de possuir baixo custo, está
9 naturalmente presente em baixas concentrações no leite (Nascimento et al., 2017).
10 Algumas vezes a ureia utilizada na fraude é a agrícola, que possui em sua
11 formulação a presença de formaldeído, como constatou-se na Operação Ouro
12 Branco, desencadeada pelo Ministério Público e Polícia Federal no Brasil, na cidade
13 de Uberaba em 2007 (Polícia Federal, 2012).

14 A adição de alcalinizantes tem como fundamento a neutralização
15 do excesso de ácidos que está presente no leite devido à elevada atividade
16 microbiana, resultado de más condições de higiene na ordenha e/ou
17 armazenamento, e/ou falta de refrigeração. As principais substâncias relatadas para
18 este fim são o bicarbonato de sódio e o hidróxido de sódio (Beloti, 2015).

19 Fraudes mistas são misturas de mais de um tipo de substância e
20 abrangem a chamada adulteração complexa (Liu et al., 2015). Nos EUA ocorreram
21 um incidente dessa natureza em 2004, envolvendo adulteração de leite com ureia,
22 sabão e amido (Qin, Chao, & Kim, 2013). Kartheek et al. (2011), relatam
23 contaminantes na proporção de 20 a 25% do volume, sem causar alterações
24 sensoriais detectáveis.

25 Os produtos lácteos ainda estão expostos a outros problemas
26 relacionados à autenticidade e adulteração, como por exemplo más condições de
27 processamento e embalagem (Esteki et al., 2018), venda de produtos vencidos para
28 empresas que os utilizam como ingredientes para formulações de outros alimentos
29 (Peng et al., 2017), e até mesmo a reembalagem destes produtos.

30 2.2 ADULTERAÇÕES ECONOMICAMENTE MOTIVADAS

31 A fraude alimentar pode ser considerada como uma das relevantes
32 questões econômicas. As adulterações de alimentos alteram a identidade e pureza

1 original do produto, causando modificações químicas e físicas através de diluições,
2 substituições, modificações ou adição de compostos estranhos a composição. Os
3 falsificadores buscam burlar os sistemas de garantia e controle de qualidade das
4 empresas ou órgãos de inspeção de alimentos, projetando ingredientes e fraudes
5 cada vez mais sofisticados, enganando a boa-fé dos consumidores e podendo
6 causar danos à saúde do consumidor. A atividade criminosa da fraude, visa o ganho
7 econômico e evasão dos sistemas de qualidade, fechando os olhos para possíveis
8 riscos à saúde. Outros termos também utilizados para designar fraude alimentar
9 incluem adulteração economicamente motivada, adulteração econômica e
10 falsificação de alimentos (Moore, Spink & Lipp, 2012).

11 Por uma diversidade de razões, geralmente ligadas ao lucro,
12 diferentes tipos de fraudes são frequentemente praticadas, e visam sempre o
13 aumento dos ganhos devido a imitações de marcas já estabelecidas, redução nos
14 custos de fabricação ou prolongamento da vida útil (Abbas et al., 2018), sendo
15 necessário devido à frequência desses casos, a implantação de sistemas mais
16 eficientes para o controle de adulterações em alimentos (Cavin et al., 2018).

17 O leite é um alimento especialmente sujeito a fraudes, podendo
18 acarretar graves danos à saúde de quem o consome, além de significativos
19 prejuízos (Yang et al., 2016). A adição de água no leite é um exemplo de fraude
20 econômica, em que se busca o aumento de volume do produto e conseqüentemente
21 aumento na lucratividade, porém reduzindo sua qualidade nutricional. Após a adição
22 fraudulenta da água, muitos ainda utilizam outros artifícios para mascarar, como por
23 exemplo a adição de compostos ricos em nitrogênio, que disfarçarão a quantificação
24 da proteína.

25 Outro ponto de importância é o aumento da demanda, resultando
26 na escassez de matérias-primas e conseqüente aumento de preços, estimulando
27 alguns produtores a aumentar o volume de seus produtos com substâncias
28 estranhas a eles (Esteki et al., 2018). A demanda por ingredientes derivados de leite
29 e o crescimento do comércio levaram ao aumento deste tipo de crime (Draher et al.,
30 2016).

31 Considerando a forte pressão econômica existente e a baixa
32 qualidade microbiológica do leite cru, a prática fraudulenta torna-se cada vez mais
33 comum e sofisticada, podendo trazer risco para toda a cadeia produtiva (Cassoli,
34 Sartori, & Machado, 2011), e reconhece-se um aumento constante nas adulterações

1 alimentícias com fins lucrativos (Tsimidou et al., 2016). Por outro lado, o público
2 consumidor também tem tomado consciência com relação a adulterações
3 economicamente motivadas, e seus riscos à saúde pública, exigindo mais rigor no
4 controle de qualidade dos produtos, tornando as fraudes um campo de pesquisa
5 crescente (Esteki et al., 2018).

6 2.2.1 Fraude por Adição de Soro de Queijo

7 Algumas substâncias apresentam grande potencial para serem
8 adicionadas ao leite de forma fraudulenta, devido à sua semelhança com os
9 componentes da matéria-prima. São eles os produtos que contêm alta porcentagem
10 de gordura, proteína e carboidrato, substâncias extraídas do próprio leite, como soro
11 de queijo e leitelho, adicionados com o propósito de aumentar o volume do produto
12 (Liu et al., 2015). Com a adição de soro de queijo ao leite não há alterações
13 sensoriais perceptíveis, nem alterações significativas do conteúdo total de proteínas,
14 que sejam detectáveis como fora da normalidade, tornando-se uma adulteração
15 bastante comum, pois resulta em aumento de volume da matéria-prima (Rocha et
16 al., 2015).

17 A elevada frequência de leite fraudado com soro de queijo, pode ser
18 explicada pelo fato de o soro ser um subproduto barato obtido durante a produção
19 de queijo e que, em muitas indústrias, não tem aproveitamento (Chávez & Jauregui,
20 2012; Nascimento et al., 2017), além do fato de que o soro de leite não representa
21 risco iminente à saúde. Contudo, essa fraude não deixa de significar implicações
22 nutricionais, econômicas e legais (Chávez & Jauregui, 2012). É uma fraude que traz
23 séria preocupação, uma vez que o soro possui nutrientes e características físico-
24 químicas semelhantes às do leite, podendo muitas vezes estar presente e não ser
25 detectado (Das et al., 2015).

26 O soro de queijo muitas vezes é um grande problema como resíduo
27 na indústria de queijos devido à necessidade de tratamento especial de resíduos,
28 por sua alta demanda biológica de oxigênio. É um alimento ainda rico em nutrientes,
29 contudo, seu custo é muito menor comparado ao do leite (Neelima, Rajput & Mann,
30 2013). O descarte de soro de leite ocorre frequentemente nas indústrias produtoras
31 de queijos, por não terem implantados processos para seu aproveitamento, e muitas
32 vezes é utilizado como adulterante do leite (Karthek et al., 2011).

1 A partir do ano de 2011, em muitas regiões do Brasil, observou-se
2 um grande aumento no fenômeno das adulterações do leite, sendo uma das mais
3 frequentes, a adição de soro de leite, que é um produto que chega a ser 90% mais
4 barato que o leite, além de sua difícil detecção utilizando testes simples (Karthek et
5 al., 2011). Segundo Alves et al. (2018), resultados obtidos em seus estudos
6 demonstraram que, em relação aos parâmetros de composição, é possível adicionar
7 até 10% de qualquer tipo de soro de leite sem que haja extrapolação de limites
8 específicos para normalidade do leite. Rocha et al. (2015), citam que na prática os
9 níveis de adulteração pela adição de soro de queijo no leite raramente excedem 25 a
10 30%. A proporção indicada pelo autor é bastante elevada, mostrando como a fraude
11 ocorre de maneira despudorada, gerando elevado ganho para os criminosos
12 fraudulentos e prejuízos para o restante da cadeia leiteira.

13 Diversos pesquisadores tratam a fraude por adição de soro de queijo
14 em leite como um grande problema para a indústria de lácteos (Mun et al., 2009;
15 Chávez & Jauregui, 2012). No entanto, sua adição ao leite está na alçada das
16 indústrias, uma vez que elas é que produzem o queijo, ou deliberadamente compram
17 o produto para adicioná-lo ao leite. O soro de queijo bovino ainda é citado na prática
18 de adição fraudulenta ao soro de outras espécies, utilizados na produção de ricota
19 (Camerini et al., 2016). A quantidade de fraudes praticadas e a gravidade das
20 mesmas, gera impacto em toda uma cadeia, desde o setor econômico até a saúde
21 pública, abalando totalmente a confiança dos consumidores em determinados
22 produtos.

23 2.2.2 Composição e Características do Soro de Queijo

24 A composição inicial do leite pode variar de acordo com fatores
25 genéticos, ambientais, sazonais, fisiológicos, nutricionais e de manejo do animal
26 (Beloti, 2015). O leite bovino cru refrigerado, segundo a legislação vigente, deve ser
27 composto, por no mínimo 11,4% de Sólidos totais, 4,3% de lactose, 2,9% de
28 proteína e 3,0% de gordura (Brasil, 2018). Do volume total de leite utilizado para a
29 fabricação de queijos, o soro representa valores entre 80% e 90% desse volume
30 (Alves et al., 2018), dependendo sempre da composição inicial da matéria prima
31 utilizada. O soro de queijo é composto em média por 93,67% de água, 4,42% de
32 lactose, herdando praticamente a totalidade deste carboidrato presente no leite,

1 0,84% de proteína, 0,77% de gordura, somando 6,33% de sólidos totais (Teixeira e
2 Fonseca, 2008).

3 Segundo o regulamento técnico em vigor, que fixa os padrões de
4 identidade e qualidade para o soro de queijo, os parâmetros exigidos para soro
5 líquido são de 6,0 a 6,8 para o pH, 0,08 a 0,14 g/100 g de ácido láctico para a acidez
6 e 5,0 g/100 mL de sólidos totais (Brasil, 2021). O soro de leite, pode ser dessecado e
7 utilizado como componente para a fabricação de bebidas lácteas, produtos de
8 panificação e confeitaria, chocolates e vários outros alimentos industrializados.

9 Teixeira e Fonseca (2008), pesquisaram os parâmetros físico-químicos
10 do soro de queijo e encontraram valores de $-0,565^{\circ}\text{H}$ para crioscopia, 6,19 para pH,
11 13,17 de acidez Dornic e 1,0253 para densidade. Esses valores são muito próximos
12 aos encontrados no leite, sendo $-0,530^{\circ}\text{H}$ a $-0,555^{\circ}\text{H}$ para análise de crioscopia, 6,4
13 a 6,8 pH, 0,14g/100g a 0,18g/100g de ácido láctico para a acidez Dornic e 1,028 a
14 1,034 para a densidade (Brasil, 2018).

15 2.2.3 Caseinomacropéptido (CMP)

16 A partir da produção de queijo, com a utilização de coalho, obtém-se
17 o soro de queijo, que é um subproduto comumente utilizado na prática de
18 adulteração por aumento de volume do leite (Bremer et al., 2008). A detecção desta
19 adulteração geralmente baseia-se na detecção do caseinomacropéptido (CMP), um
20 glicomacropéptido (GMP) específico, liberado no processo de coagulação do leite
21 durante a fabricação do queijo (Bremer et al., 2008; Cassoli, Sartori & Machado,
22 2011; Motta et al., 2014; Bilge et al., 2016; Abbas et al., 2018).

23 O CMP é um composto biologicamente ativo, que é liberado pela
24 ação da quimosina na k-caseína, durante fabricação do queijo (Neelima, Rajput &
25 Mann, 2013). A quimosina age na ligação peptídica 105 e 106, dos aminoácidos
26 fenilalanina e metionina, respectivamente, dando origem ao CMP. O CMP tem uma
27 concentração estimada de 1,2 a 1,5 g L⁻¹ no soro do queijo, correspondendo a cerca
28 de 20% da proteína total presente no soro (Neelima, Rajput & Mann, 2013), sendo
29 equivalente a valores entre 1 e 5% da composição total do soro, podendo variar de
30 acordo com fatores, como raça, genética, teor de gordura, temperatura e
31 armazenamento (Motta et al., 2014). Esse peptídeo permanece no soro do queijo e é
32 muito utilizado como um biomarcador em casos de adulteração de leite por adição

1 de soro de queijo (Motta et al., 2014; Abbas et al., 2018;).

2 A maioria das técnicas para a detecção de CMP, foram
3 desenvolvidas originalmente para a utilização do marcador de proteólise em leite cru
4 ou marcador de leite bovino em produtos lácteos de outras espécies, e não para a
5 detecção fraudulenta de soro de queijo (Bremer et al., 2008). Motta et al. (2014), em
6 sua pesquisa, utilizando amostras de leite recém obtidas de vacas leiteiras,
7 apontaram uma quantidade variável de CMP endógena no leite. Esse CMP não é
8 originário da fraude por adição de soro de queijo. Os autores destacam que,
9 hipoteticamente, um valor basal de CMP deve ser estimado, pois este
10 provavelmente pode ser causado por erros naturais na síntese proteica, associados
11 à proteólise endógena e também à respostas fisiológicas relacionadas à
12 alimentação, clima e outros fatores. Os autores julgam esse fator basal como muito
13 importante para se considerar uma revisão de limites e parâmetros para CMP
14 utilizado como marcador.

15 Existe um problema na interpretação dos métodos de detecção de
16 soro de queijo por CLAE, pois o CMP, devido à sua heterogeneidade, não se
17 separa, aparecendo como um único pico cromatográfico. Com a variação nos
18 peptídeos de CMP, são necessários esforços para obtenção de condições
19 experimentais ideais de pH, tampão de eluição, temperatura entre outros, para a
20 recuperação máxima de CMP do soro de queijo (Neelima, Rajput & Mann, 2013).

21 A detecção de CMP ainda é um dos métodos analíticos mais
22 utilizados na detecção do soro de queijo em leite (Vieira et al., 2015). Porém, uma
23 porcentagem de amostras pode apresentar resultados falso-positivos, devido à
24 presença do pseudo-caseinomacropeptídeo (pseudo-CMP) (Bremer et al., 2008).

25 2.2.3.1 Pseudo-caseinomacropeptídeo

26 Um produto semelhante à CMP, conhecido como pseudo-CMP,
27 pode ser formado no leite líquido devido à ação de proteases psicrotróficas (Noni &
28 Resmini, 2005). Entretanto, a produção de falso CMP, ocorrerá em condições
29 extremas, como em altas contagens de microrganismos psicrotróficos e
30 armazenamento sob elevadas temperaturas (Bremer et al., 2008; Mun et al., 2009).

31 A atividade de enzimas proteolíticas, produzidas por microrganismos
32 psicrotróficos presentes no leite, pode provocar dificuldades no controle de

1 qualidade do produto (Beloti, 2015). O problema é considerável, principalmente
2 quando, como ocorre no Brasil, permite-se o resfriamento de todo o leite produzido
3 no país, por até 48 h na propriedade leiteira, mas as condições de produção ainda
4 deixam a desejar em higiene. Como resultado, considerando que boa parte dos
5 contaminantes habituais do leite são microrganismos psicrotóxicos, depois de
6 algumas horas de adaptação metabólica à temperatura, eles voltam a crescer e se
7 multiplicar, comprometendo o esperado controle do crescimento microbiano
8 promovido pelo resfriamento. Como agravante, esses microrganismos, em
9 temperatura de refrigeração, utilizam preferencialmente o metabolismo proteolítico,
10 produzindo grandes quantidades de proteases, entre elas as que clivam a k-caseína
11 e produzem o fragmento chamado pseudo-CMP. Estas enzimas clivam a porção k-
12 caseína da micela de caseína, entre os aminoácidos 106 (metionina) e 107
13 (arginina). O produto que sobra após essa quebra é o pseudo-CMP que apresenta
14 63 aminoácidos, sendo diferenciado do CMP verdadeiro, que possui 64
15 aminoácidos, apenas pela ausência da metionina. As proteases são termoestáveis,
16 continuando a sua ação mesmo após o tratamento térmico do leite (Motta et al.,
17 2014).

18 A presença do pseudo-CMP pode ser um fator limitante aos testes
19 que detectam a ocorrência de fraude por adição de soro de queijo através do CMP
20 (Mun et al., 2009), uma vez que a semelhança entre CMP e pseudo-CMP pode
21 interferir nos resultados como falso-positivos.

22 2.2.4 Processo de Coagulação e Formação do Caseinomacropeptídeo

23 A massa do queijo pode ser obtida através da utilização de
24 substâncias que promovam a coagulação do leite, como a pepsina, a quimosina, os
25 coagulantes vegetais e ácidos. Coalho é a denominação mais utilizada para
26 produtos extraídos de origem animal e coagulantes para produtos de origem
27 microbiana e vegetal (Lourenço Neto, 2013).

28 Antigamente era muito comum para a produção de queijo a
29 utilização de coalhos extraídos do quarto estômago de jovens ruminantes lactantes,
30 em que a quimosina representa cerca de 90% e a pepsina 10% da composição.
31 Contudo, hoje o produto mais utilizado, tanto nas indústrias como em produções
32 informais, para a produção de queijos, é a quimosina obtida através da produção de

1 microrganismos ou microrganismos geneticamente modificados, como *Rhizomucor*
2 *miehei*, *Mucor pusillus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* var. *awamori*,
3 *Kluyveromyces lactis*. Dentre os coagulantes de origem vegetal capazes de coagular
4 o leite temos a papaína, a bromelina e a ficina, porém, a enzima de origem vegetal
5 mais utilizada, principalmente em queijos portugueses, como o Serra da Estrela, é a
6 cardosina, extraída da flor do cardo (Lourenço Neto, 2013).

7 A coagulação ácida também é uma alternativa utilizada, com menor
8 frequência, para a coagulação da massa do queijo. Neste caso, são utilizados ácidos
9 orgânicos, como o ácido cítrico ou láctico (Lourenço Neto, 2013).

10 A caseína é uma fosfoproteína com alta sensibilidade à acidez. Em
11 pH 4,6, a caseína é aglomerada em grandes micelas, o que é uma característica
12 muito importante para a produção de derivados, como o queijo. A caseína compõe-
13 se de quatro variantes genéticas principais, são elas a α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -
14 caseína e κ -caseína. A κ -caseína por ser a estrutura externa ou mais superficial da
15 micela, devido ao baixo conteúdo de ésteres fosfato presentes nesta porção, possui
16 maior solubilidade em meio contendo cálcio, sendo essas propriedades
17 responsáveis por seu papel na estabilização da micela. A porção κ -caseína é o
18 substrato de ação de proteólise do coagulante na produção do queijo (Beloti, 2015).

19 Durante a ação do coagulante na micela de caseína para a formação
20 da massa do queijo, uma das primeiras reações que ocorre é a hidrólise da κ -
21 caseína na ligação entre os aminoácidos 105 e 106 (Lourenço Neto, 2013; Beloti,
22 2015). O seguimento 1 a 105 corresponde à para- κ -caseína, que permanece ligada
23 às caseínas α e β e integrada à micela hidrofóbica, constituindo a massa do queijo.
24 Já o seguimento 106 a 169, corresponde ao caseinomacropéptido (CMP), que é
25 solúvel no soro (Lourenço Neto, 2013).

26 2.2.5 Métodos de Detecção de Soro de Queijo em Leite

27 Apenas nos últimos anos, devido ao desenvolvimento tecnológico de
28 análises, foi possível a detecção de compostos fraudulentos nos alimentos, prática
29 essa que já era realizada nos impérios grego e romano (Silva, 2018). A autenticidade
30 de um produto é definida pela sua conformidade com os regulamentos, protocolos
31 de produção, composição dos ingredientes, entre outros (Huck, Pezzei & Huck-
32 pezei, 2016). Inclui-se nos testes de autenticidade de alimentos, a análise de seus

1 ingredientes, a determinação de sua origem geográfica e a análise da tecnologia de
2 produção (Abbas et al., 2018).

3 Existe uma real dificuldade na determinação da autenticidade do
4 leite e seus derivados, apesar das vantagens das novas técnicas analíticas, a
5 composição do leite pode estar relacionada a diversos fatores, como a influência
6 ambiental do clima e estações do ano, diferenças individuais dos animais, estágio de
7 lactação, alimentação e outros. Esses fatores podem contribuir para dificultar a
8 autenticação desses produtos (Kamal & Karoui, 2015). Portanto, tanto em métodos
9 quantitativos como qualitativos apresentados em diretrizes oficiais, devem ser
10 realizados procedimentos de validação analítica (Botelho et al., 2015).

11 Devido à sobra de um grande volume do soro de queijo nas
12 indústrias de laticínios, este é, com certa frequência, utilizado para fraudar o leite
13 (Moore, Spink & Lipp, 2012). Como as características físico-químicas do soro de
14 queijo e do leite são muito parecidas, isso torna a detecção desta adulteração
15 complexa (Vieira et al., 2015). É a verificação de correspondência do produto com as
16 informações do seu rótulo, e sua conformidade com as disposições das leis e
17 regulamentos que possibilita a autenticação desses produtos alimentícios. Esforços
18 contínuos de pesquisadores são voltados para reagrupamento de técnicas
19 analíticas, principalmente como cromatografia, espectroscopia, identificação de
20 DNA, Elisa e outros, para melhorar a sensibilidade e especificidade das análises que
21 garantem a idoneidade dos alimentos. Técnicas sofisticadas devem continuar
22 avançando, visando abordagens de questões emergentes sobre qualidade de
23 alimentos e proteção da marca e do seu consumidor (Abbas et al., 2018).

24 Em se tratando de fraude alimentar, são numerosos os
25 equipamentos analíticos utilizados para este fim e com diversos graus de
26 especialização (Stadler et al., 2016), fazendo com que os métodos físico químicos
27 sejam deixados de lado na comprovação de adulterações, já que muitos são
28 demorados, trabalhosos e podem não produzir os resultados precisos e desejados
29 (Botelho et al., 2015).

30 Buscando métodos diferenciados para a detecção de substâncias
31 que estão ausentes na composição do leite, como o soro de queijo, muitos autores
32 utilizaram em suas pesquisas metodologias diversas, como imunoensaios (Bremer et
33 al., 2008; Mun et al., 2009; Chávez & Jauregui, 2012), biossensores (Bremer et al.,
34 2008; Das et al., 2011), eletroforese de zona capilar (Oliveira et al., 2016),

1 ressonância magnética nuclear (Harnly et al., 2018; Poliana M Santos, Pereira-filho,
2 & Colnago, 2016), cromatografia gasosa (Oliveira et al., 2016), entre outros.

3 Outras metodologias muito utilizadas para este fim, são a
4 espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), espectroscopia por infravermelho
5 médio (MIR) e espectroscopia por infravermelho médio com transformada de Fourier
6 (FTIR).

7 Zhang et al. (2014), Yang et al. (2016), Forchetti & Poppi (2017) e
8 Karunathilaka et al. (2018), em suas pesquisas por adulterantes em leite, utilizaram
9 NIR, sendo que o primeiro autor constatou que o equipamento distingue bem o leite
10 adulterado por soro de queijo com porcentagens iguais ou maiores que 5% de
11 adulteração. Santos, Pereira-filho, & Rodriguez-saona (2015), utilizaram o
12 espectroscópio por infravermelho médio (MIR) em pesquisas para detecção de soro
13 de queijo presente no leite, sendo um equipamento de uso simples e não destrutivo,
14 e obtiveram valores de detecção de soro de queijo maiores que 7,5 g L⁻¹. Já outros
15 autores optaram pelo uso do espectroscópio por infravermelho médio com
16 transformada de Fourier (FTIR) na pesquisa por soro de queijo em leite (Cassoli,
17 Sartori & Machado, 2011; Liu et al., 2015; Mara et al., 2015; Vieira et al., 2015;
18 Barbosa et al., 2017). Cassoli, Sartori & Machado (2011) observaram resultados de
19 baixa sensibilidade utilizando o método FTIR, mesmo em amostras de leite com
20 altas concentrações de soro. Já Liu et al. (2015) detectaram fraudes de soro de
21 queijo em leite acima de 5% e Vieira et al. (2015) utilizaram valores de 6 a 28% de
22 soro na validação de sua pesquisa, ambos utilizaram FTIR.

23 A utilização de biomarcadores para a detecção de soro de queijo no
24 leite também pode ser uma boa alternativa. Medina et al. (2019) citaram a
25 cromatografia em sua revisão sobre biomarcadores que podem ser utilizados para
26 monitoramento da autenticidade de diversos alimentos. Já Tripathy et al. (2017) em
27 sua pesquisa por adulterantes em leite, combinaram dois marcadores para a
28 obtenção de melhores resultados, demonstrando que o desempenho é melhor do
29 que com a utilização de apenas um marcador individual. Abbas et al. (2018),
30 utilizaram em sua pesquisa o CMP como um biomarcador para a detecção de fraude
31 por adição de soro de leite em queijo, mostrando precisão satisfatória e limite de
32 detecção de 1,0 µg mL⁻¹.

33 Diversos equipamentos e métodos são utilizados, porém, para a
34 pesquisa de soro de queijo em leite, há inúmeros registros da utilização de

1 espectrometria de massas (MS) na detecção de CMP, sendo esta utilizada por
2 muitos pesquisadores (Jia et al., 2014; Motta et al., 2014; Makhoul et al., 2016;
3 Lenardon et al., 2017). Makhoul et al. (2016) em sua pesquisa utilizando MS,
4 verificou a qualidade de diferentes ingredientes lácteos, como leite em pó e soro de
5 leite em pó. O autor classificou a técnica como uma ferramenta de controle de
6 qualidade de alto rendimento, representando uma ferramenta promissora para
7 controle de qualidade de maneira rápida. Motta et al. (2014), desenvolveu um
8 método analítico para o alcance de resultados que confirmassem a presença de
9 CMP. O pesquisador utilizou preparo de amostras baseado em métodos proteômicos
10 e espectrometria de massas para obtenção dos resultados.

11 A espectrometria de massas é habitualmente utilizada devido à sua
12 capacidade de distinção de pequenas diferenças na comparação de matrizes com
13 alta complexidade (Medina et al., 2019), como é o caso da determinação da fraude
14 por adição de soro, utilizando como marcador o CMP, que é resultado da
15 coagulação do leite, e tendo que diferenciá-lo do pseudo-CMP que é produto da
16 atividade microbiana. Abordagens mais sofisticadas, como a utilização de
17 espectrometria de massas acoplada a diversos detectores são grandes aliadas na
18 detecção de diversas fraudes, porém exigem instalações onerosas e modernas além
19 de mão de obra qualificada (Bremer et al., 2008; Stadler et al., 2016), não sendo,
20 muitas vezes, viável aos laboratórios de análises de rotina. Há então, a necessidade
21 do desenvolvimento de alternativas menos onerosas, além da alta demanda
22 analítica que requer procedimentos mais rápidos e simplificados.

23 A grande maioria dos métodos que já foram utilizados para a
24 detecção do soro de queijo no leite se concentram na busca pelo CMP (Rocha et al.,
25 2015) e, embora vários métodos e ferramentas consigam identificá-lo e quantificá-lo,
26 apenas a MS pode diferenciá-lo com precisão do pseudo-CMP. Mara et al. (2015),
27 comentam ainda, que alguns métodos para a detecção de soro de queijo em leite
28 demandam longo tempo e trabalho laboratorial especializado, possuindo muitas
29 vezes limites mínimos de detecção quantitativa muito altos. Por isso, se faz
30 fundamental o desenvolvimento de análises simples, rápidas e precisas para a
31 detecção do soro de queijo no leite (Vieira et al., 2015).

1 2.3 LEGISLAÇÃO PARA A DETECÇÃO DE FRAUDE POR ADIÇÃO DE SORO DE QUEIJO

2 O CMP e o pseudo-CMP se diferenciam pela presença de um único
3 aminoácido, a metionina, que está presente no CMP, sendo necessária uma
4 diferenciação segura para a indicação da presença ou não de soro de queijo no leite
5 (Motta et al., 2014).

6 De acordo com o Manual de Métodos Oficiais para Análise de
7 Alimentos de Origem Animal, o método oficial para a detecção e quantificação de
8 CMP emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – do inglês HPLC),
9 com separação em coluna de permeação em gel ou exclusão e detecção em
10 ultravioleta (UV) (Brasil, 2019). Porém, muito autores citam a ineficiência na
11 diferenciação do CMP e pseudo-CMP através de análises por HPLC (Recio & Lo,
12 1996; Neelima, Rajput & Mann, 2013; Rocha et al., 2015). Segundo diversos
13 pesquisadores, existe a necessidade da utilização do HPLC acoplado ao
14 espectrômetro de massas (HPLC/MS) para melhores resultados de diferenciação
15 entre CMP e pseudo-CMP (Lenardon et al., 2017; Lourdes et al., 2013; Motta et al.,
16 2014).

17 2.4 NOVO MÉTODO PARA A DETECÇÃO DE SORO DE QUEIJO NO LEITE

18 2.4.1 Desenvolvimento de Novo Método Analítico

19 A autenticidade do leite deve ser constantemente investigada, sendo
20 de suma importância do ponto de vista econômico e de saúde pública (Karthek et
21 al., 2011).

22 Para impedir adulterações e consequentemente proteger a saúde
23 pública, as autoridades se esforçam continuamente para adotar medidas mais
24 rigorosas. Porém, é muito difícil obter excelência, pois as adulterações são cada vez
25 mais sofisticadas (Calvano et al., 2013). O aumento na demanda pelo
26 monitoramento de produtos, a fim de detectar essas irregularidades, promove a
27 busca pelo desenvolvimento de novos procedimentos analíticos, incluindo uma
28 enorme gama de técnicas, com diversidade de equipamentos, custos e
29 complexidade no preparo de amostras (Nascimento et al., 2017).

1 As autoridades veem urgência na ampliação das metodologias
2 oficiais de monitoramento, que possibilitem um controle preciso dos produtos para a
3 indústria de alimentos. Para o estabelecimento desse controle sobre os produtos
4 alimentícios em circulação no mercado, busca-se por ferramentas que se traduzam
5 em métodos analíticos rápidos, eficazes e confiáveis, para a verificação da
6 autenticidade e rastreabilidade de determinado produto (Abbas et al., 2018), pois
7 tratando-se da adulteração desconhecida de alimentos, os sistemas tradicionais de
8 controle de qualidade podem não ser aplicáveis de forma satisfatória (Stadler et al.,
9 2016; Spink et al., 2017). Diante de um cenário em que ocorrem diversas fraudes, é
10 cada vez mais importante a capacidade de detecção rápida e confiável de
11 adulterações em leite (Qin, Chao & Kim, 2013; Jia et al., 2014; Zhang et al., 2014;
12 Das et al., 2015; Kamal & Karoui, 2015; Draher et al., 2016; Fanali, Dugo, &
13 Mondello, 2016; Yang et al., 2016).

14 Para o desenvolvimento de métodos eficientes na detecção de
15 fraudes, primeiro é necessário entender os tipos de fraudes e como essas ocorrem
16 na cadeia de produção e beneficiamento do produto. A compreensão mais
17 aprofundada dos padrões de adulterações e suas variações nos alimentos seria
18 eficiente para os sistemas de controle de qualidade de alimentos possivelmente
19 fraudados (Tähkää et al., 2015), já que a medida em que os laboratórios de
20 pesquisa aprimoram seus métodos de detecção, os praticantes de fraudes também
21 aperfeiçoam as fraudes (Lourdes et al., 2013; Peng et al., 2017; Medina et al., 2019).

22 2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE ou HPLC

23 O HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é um
24 instrumento vastamente utilizado em análises químicas, pois proporciona
25 confiabilidade nos resultados, além de boa sensibilidade e especificidade. Esse
26 instrumento é composto por um reservatório e um sistema de dispensa de solventes,
27 sendo este solvente utilizado como fase móvel, no qual o líquido é bombeado
28 através da coluna. As colunas são cilindros de aço inox, recheadas com a chamada
29 fase estacionária, que pode conter partículas de diversos diâmetros, e seletividade,
30 compostas por sílica, adsorventes de sílica modificada, polimérica ou de carbono e
31 adsorventes à base de óxidos metálicos. Os mecanismos de retenção que são
32 vastamente utilizados nas separações cromatográficas empregam fases reversa e

1 normal. Para compostos polares e moderadamente polares a separação pode ser
2 feita por fase normal. Já na fase reversa, a fase estacionária é hidrofóbica e a fase
3 móvel é altamente polar. Há uma grande variedade de colunas de fase reversa,
4 sendo as constituídas por sílica C8 e C18 as mais utilizadas. As fases móveis mais
5 utilizadas podem ser constituídas por misturas de água e solventes orgânicos, sendo
6 muito comum a acetonitrila, o metanol ou o tetrahidrofurano. Muitos componentes
7 alimentares podem ser analisados através de HPLC, como vitaminas, carboidratos,
8 proteínas, aminoácidos, lipídios e substâncias bioativas menores, além de ser uma
9 ótima opção na detecção de fraudes em alimentos, como a substituição ou adição
10 de ingredientes (Fanali et al., 2016).

11 Ingredientes específicos podem ser determinados em diversos
12 produtos alimentares utilizando métodos cromatográficos, como a cromatografia
13 líquida e a gasosa. O emprego de diferentes tipos de detectores possibilita que
14 grande número de compostos sejam separados através dessas técnicas, permitindo
15 a sua identificação. Os dados provenientes desses métodos são comparados a um
16 banco de dados ou com resultados da análise de padrões autênticos utilizados para
17 identificação da composição do alimento. A principal diferença entre as
18 cromatografias líquida e gasosa é que a segunda é mais adequada para análises de
19 componentes voláteis. As técnicas cromatográficas proporcionam a identificação
20 segura da composição dos alimentos e a sua caracterização (Abbas et al., 2018),
21 visto que oferecem alta sensibilidade, reprodutibilidade e robustez (Esteki et al.,
22 2018).

23 Tratando-se de análise de alimentos as técnicas de separação são
24 amplamente utilizadas, com a capacidade para a realização de análises
25 quantitativas e qualitativas de diferentes classes alimentares, sendo que grande
26 parte dos alimentos podem ser testados utilizando esses equipamentos (Fanali et al.,
27 2016). Moore, Spink & Lipp (2012), em sua revisão sobre adulterações alimentares,
28 buscaram os métodos mais utilizados entre os pesquisadores para análises
29 confiáveis, estando entre as 5 principais tecnologias instrumentais, as
30 cromatografias líquida e gasosa. A cromatografia líquida e a gasosa e também a
31 espectroscopia por infravermelho são instrumentos que estão disponíveis em grande
32 parte dos laboratórios de controle de qualidade de alimentos, podendo ser
33 amplamente utilizados na prevenção de fraudes alimentares.

34 A técnica de separação utilizada pela cromatografia é muito

1 importante e eficiente, podendo ser aplicada à alimentos complexos, além de ser
2 muito utilizada na detecção de substâncias estranhas (Zhang et al., 2011). O HPLC
3 permite a medição simultânea de vários compostos em uma única análise, sendo
4 uma ótima ferramenta para a matéria-prima leite, por permitir identificar e quantificar
5 diversas moléculas. Essa ferramenta é muito importante para a determinação de
6 autenticidade do leite e derivados. As técnicas de LC para a determinação da
7 autenticidade do produto e consequente detecção de adulteração, geralmente
8 incluem processos de extração de amostras, considerados de grande importância
9 para os métodos analíticos (Kamal & Karoui, 2015).

10 Se tratando de técnicas analíticas para fins de separação,
11 identificação e quantificação de componentes amostrais, o HPLC se destaca como
12 uma das melhores (Kamal & Karoui, 2015), sendo vastamente utilizado em casos de
13 fraude alimentar (Tsimidou et al., 2016).

14 Contudo, o método utilizando HPLC para pesquisa do CMP em leite,
15 além de mais demorado, sofre interferência pela atividade proteolítica de bactérias
16 psicrotrópicas (Recio & Lo, 1996), principalmente no leite proveniente de
17 propriedades com baixa qualidade microbiológica e/ou armazenamento prolongado
18 (Rocha et al., 2015), podendo apresentar falso positivos.

19 2.4.3 Substâncias Residuais no Soro de Queijo

20 A dificuldade em se utilizar o CMP como marcador para a fraude por
21 adição de soro ao leite, conduz à necessidade de encontrar de outras substâncias
22 resultantes da fabricação do queijo, sendo necessário que essas permaneçam no
23 soro e que não existam na composição do leite, nem sejam produzidas por
24 microrganismos, permitindo desta forma uma detecção inequívoca da fraude.

25 O conhecimento minucioso dos componentes do soro, pode permitir a
26 identificação de substâncias decorrentes do processamento do queijo, que estejam
27 presentes no soro e ausentes no leite, permitindo a detecção da fraude de modo
28 mais simples.

29 2.4.3.1 Benzoato de Sódio e Sorbato de Potássio

30 O uso de conservantes químicos em alimentos é frequente nas

1 indústrias, pois esses agentes evitam a deterioração dos alimentos, sendo
2 considerados como antimicrobianos por causar a inibição do crescimento de
3 microrganismos (Mota et al., 2003). Desta forma evitam alterações consideradas
4 indesejáveis nesses produtos, além de manter o frescor, sabor, textura e a aparência
5 dos mesmos (Carocho, Morales & Ferreira, 2015; Taylor et al., 2015). O ácido
6 benzoico e o ácido sórbico e seus sais são exemplos de conservantes amplamente
7 utilizados em diversos alimentos. No entanto, o uso de conservantes em leite não é
8 permitido no Brasil (Brasil, 2018).

9 O HPLC é o método oficial, de acordo com o Manual de Métodos
10 Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, para a detecção dos
11 conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em amostras de leite, leite
12 em pó, iogurte, leites fermentados e queijos e é adequado para medir o conteúdo de
13 ambos os compostos em níveis superiores a 5 mg kg⁻¹ (Brasil, 2019). Alguns autores
14 utilizaram em suas pesquisas a cromatografia líquida para análise da presença de
15 benzoato de sódio e sorbato de potássio em alimentos, obtendo bons resultados
16 (Pylypiw Jr & Grether, 2000; Gören et al., 2015).

17 Esses conservantes são utilizados para a conservação dos
18 coagulantes comerciais utilizados para a coagulação da massa durante a fabricação
19 de queijos. Parte desses conservantes presentes nos coagulantes, permanecem no
20 soro após a coagulação da massa, sendo a presença de resíduos desses
21 conservantes no leite, um possível indicador da presença de soro de queijo nesta
22 amostra. O benzoato de sódio e o sorbato de potássio não são conservantes
23 utilizados diretamente no leite pelos fraudadores que, para esse fim, preferem o
24 formol, o peróxido de hidrogênio e o hipoclorito. Assim, há grandes chances de que
25 ao serem encontrados no leite, o benzoato e o sorbato representem uma fraude por
26 adição de soro, e essa possibilidade merece investigação mais profunda.

1 REFERÊNCIAS

- 2 Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Miku, T., Le, T., & Vuli, A. (2018). Analytical
3 methods used for the authentication of food of animal origin, 246(October 2017),
4 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007>
- 5 Alves, É. D. P., Amico, L. D., José, A., Guimarães, K., Walter, H., Garcia, B., &
6 Fagnani, R. (2018). Milk adulteration with acidified rennet whey : a limitation for
7 caseinomacropeptide detection by high-performance liquid chromatography,
8 (August 2017). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8846>
- 9 Barbosa, T., Laerte, C., Cassoli, D., Henrique, P., Cerqueira, R., Krystine, H., ...
10 Machado, F. (2017). Adulteration identification in raw milk using Fourier
11 transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*.
12 <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2680-y>
- 13 Beloti, Vanerli. Leite: Obtenção, inspeção e qualidade. Editora Planta, Londrina,
14 2015.
- 15 Bilge, G., Sezer, B., Efe, K., Berberoglu, H., Topcu, A., & Hakki, I. (2016).
16 Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced
17 breakdown spectroscopy. *Food Chemistry*, 212, 183–188.
18 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.169>
- 19 Botelho, B. G., Reis, N., Oliveira, L. S., & Sena, M. M. (2015). Development and
20 analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five
21 adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *FOOD*
22 *CHEMISTRY*, 181, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>
- 23 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº
24 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a
25 identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru
26 refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da
27 União, Brasília, 2018.
- 28 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos
29 oficiais para análise de alimentos de origem animal. Ministério da Agricultura,
30 Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2. ed. – Brasília
31 : MAPA, 2019.
- 32 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 386, de 25 de
33 agosto de 2021. Altera o anexo do Regulamento Técnico de Identidade e

- 1 Qualidade do soro de leite. Diário Oficial da União, Brasília, 2021.
- 2 Bremer, M. G. E. G., Kemmers-voncken, A. E. M., Boers, E. A. M., Frankhuizen, R.,
3 & Haasnoot, W. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection
4 of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder, *18*, 294–
5 302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.008>
- 6 Calvano, C. D., Monopoli, A., Loizzo P., Faccia, M., Zambonin, C., (2013). Proteomic
7 Approach Based on MALDI-TOF MS To Detect Powdered Milk in Fresh Cow ' s
8 Milk.
- 9 Camerini, S., Montepeloso, E., Casella, M., Crescenzi, M., Maria, R., & Fuselli, F.
10 (2016). Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in water
11 buffalo , sheep , or goat Italian ricotta cheese, *197*, 1240–1248.
12 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.073>
- 13 Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Trends in Food Science &
14 Technology Natural food additives: Quo vadis ?, *45*, 284–295.
15 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- 16 Cassoli, L. D., Sartori, B., & Machado, P. F. (2011). Revista Brasileira de Zootecnia
17 The use of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to determine adulterants
18 in raw milk, 2591–2596.
- 19 Cavin, C., Cottenet, G., Fuerer, C., Tran, L., & Zbinden, P. (2018). *Food Fraud*
20 *Vulnerabilities in the Supply Chain: An Industry Perspective. Encyclopedia of*
21 *Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21788-5>
- 22 Chávez, N. A., & Jauregui, J. (2012). A highly sensitive sandwich ELISA for the
23 determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk, 121–132.
24 <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0052-3>
- 25 Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2011). Sensors and
26 Actuators A: Physical Performance study of a “ constant phase angle based ”
27 impedance sensor to detect milk adulteration. *Sensors & Actuators: A. Physical*,
28 *167*(2), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2011.02.041>
- 29 Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2015). A low cost
30 instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. *ISA*
31 *Transactions*, *56*, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2014.11.021>
- 32 Draher, J., Ehling, S., Cellar, N., Reddy, T., Henion, J., & Sousou, N. (2016).
33 Determination of emerging nitrogenous economic adulterants in milk proteins by
34 high-performance liquid chromatography / compact mass spectrometry,

- 1 (January), 1265–1272. <https://doi.org/10.1002/rcm.7568>
- 2 Esteki, M., Simal-gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., & Dashtaki, E. (2018). A
3 review on the application of chromatographic methods , coupled to
4 chemometrics , for food authentication. *Food Control*, 93(June), 165–182.
5 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.015>
- 6 Fanali, C., Dugo, L., & Mondello, L. (2016). 10 - *Advances in Chromatographic*
7 *Techniques for Food Authenticity Testing. Advances in Food Authenticity*
8 *Testing*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00010-2>
- 9 Forchetti, A. P., & Poppi, R. J. (2017). LWT - Food Science and Technology Use of
10 NIR hyperspectral imaging and multivariate curve resolution (MCR) for
11 detection and quanti fi cation of adulterants in milk powder. *LWT - Food Science*
12 *and Technology*, 76, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.046>
- 13 Gören, A. C, Bilsel, G., Simsek, A., Bilsel, M., Akçadag, F., Topal, K., Ozgen, H.
14 (2015). HPLC and LC – MS / MS methods for determination of sodium benzoate
15 and potassium sorbate in food and beverages : Performances of local accredited
16 laboratories via proficiency tests in Turkey, 175, 273–279.
17 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.094>
- 18 Harnly, J., Bergana, M. M., Adams, K. M., Xie, Z., & Moore, C. (2018). Variance of
19 Commercial Powdered Milks Analyzed by Proton Nuclear Magnetic Resonance
20 and Impact on Detection of Adulterants. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00432>
- 21 Huck, C. W., Pezzeti, C. K., & Huck-pezzeti, V. A. C. (2016). ScienceDirect An
22 industry perspective of food fraud. *Current Opinion in Food Science*, 10, 32–37.
23 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.07.004>
- 24 Jia, W., Ling, Y., Lin, Y., Chang, J., & Chu, X. (2014). Analysis of additives in dairy
25 products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass
26 spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1336, 67–75.
27 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.028>
- 28 Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Trends in Food Science & Technology Analytical
29 methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and
30 detecting the adulteration of dairy products : A review. *Trends in Food Science &*
31 *Technology*, 46(1), 27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- 32 Kartheek, M., Smith, A. A., Muthu, A. K., & Manavalan, R. (2011). Determination of
33 Adulterants in Food : A Review, 3(2), 629–636.
- 34 Karunathilaka, S. R., Jean, B., He, K., & Kyu, J. (2018). Non-targeted NIR

- 1 spectroscopy and SIMCA classification for commercial milk powder
2 authentication : A study using eleven potential adulterants. *Heliyon*, (September),
3 e00806. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00806>
- 4 Lenardon, L., Meneghini, L. Z., Hoff, R. B., Magalhães, T., Motta, C., Pizzolato, T. M.,
5 ... Bergold, A. M. (2017). Determination of Caseinomacropeptide in Brazilian
6 Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
7 Determination of Caseinomacropeptide in Brazilian Bovine Milk by High-
8 performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, 2719(June).
9 <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1263644>
- 10 Liu, J., Ren, J., Liu, Z., & Guo, B. (2015). Short communication A new
11 comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food*
12 *Chemistry*, 172, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063>
- 13 Lourdes, V. De, Finete, M., Martins, M., Ferreira, F., Marques, D. C., Duarte, A., &
14 Netto, P. (2013). Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with
15 melamine , urea and ammonium sulphate , combining Kjeldahl and classical
16 spectrophotometric methods ?, 141, 3649–3655.
17 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.046>
- 18 Lourenço Neto, J. P. M. (2013) Queijos: aspectos tecnológicos. São Paulo: Master
19 Graf, 2013.
- 20 Makhoul, S., Yener, S., Khomenko, I., Capozzi, V., Cappellin, L., Aprea, E., &
21 Scampicchio, M. (2016). Rapid non-invasive quality control of semi- finished
22 products for the food industry by direct injection mass spectrometry headspace
23 analysis: the case of milk powder , whey powder and anhydrous milk fat,
24 (January), 782–791. <https://doi.org/10.1002/jms.3801>
- 25 Mara, B., Carvalho, A. De, Millena, L., Carvalho, D., Sélia, J., Antônio, L., ...
26 Carvalho, P. De. (2015). Rapid detection of whey in milk powder samples by
27 spectrophotometric and multivariate calibration. *FOOD CHEMISTRY*, 174, 1–7.
28 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.003>
- 29 Medina, S., Pereira, J. A., Silva, P., Perestrelo, R., & Câmara, J. S. (2019). Food
30 fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety. *Food*
31 *Chemistry*, 278 (November 2018), 144–162.
32 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.046>
- 33 Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and Application of a
34 Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration

- 1 from 1980 to 2010, 77(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>
- 2 Mota, F. J. M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Cunha, S. C., Beatriz, M., & Oliveira, P. P.
3 (2003). Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic
4 acids in foodstuffs, 82, 469–473. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00116-](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00116-X)
5 X
- 6 Motta, T. M. C., Hoff, R. B., Barreto, F., Andrade, R. B. S., Lorenzini, D. M.,
7 Meneghini, L. Z., & Pizzolato, T. M. (2014). Talanta Detection and con fi rmation
8 of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation
9 and liquid chromatography – electrospray – tandem mass spectrometry analysis.
10 *Talanta*, 120, 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.093>
- 11 Mun, M., Daury, C., Weymuth, H., Kemmers-voncken, A. E. M., & Corbato, V. (2009).
12 Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added
13 bovine rennet whey in milk and milk powder, 19, 205–208.
14 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.016>
- 15 Nascimento, C. F., Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Rocha, F. R. P. (2017).
16 Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry*, 221,
17 1232–1244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>
- 18 Neelima, S. R., Rajput, Y. S., & Mann, B. (2013). Chemical and functional properties
19 of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey
20 adulteration in milk : a review, 21–43. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0095-0>
- 21 Noni, I. De, & Resmini, P. (2005). Food Chemistry Identification of rennet-whey solids
22 in “ traditional butter ” by means of HPLC / ESI-MS of non-glycosylated
23 caseinomacropeptide A, 93, 65–72.
24 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.011>
- 25 Oliveira, T. De, Lee, B., Porto, S., José, M., Bell, V., Tuler, Í., ... Oliveira, L. De.
26 (2016). Capillary zone electrophoresis for fatty acids with chemometrics for the
27 determination of milk adulteration by whey addition. *Food Chemistry*, 213, 647–
28 653. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.035>
- 29 Peng, G., Chang, M., Fang, M., Liao, C., Tsai, C., Tseng, S., ... Cheng, H. (2017).
30 Incidents of major food adulteration in Taiwan between 2011 and 2015 Ministry
31 of Economic Affairs. *Food Control*, 72, 145–152.
32 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.043>
- 33 Polícia Federal. Justiça condena acusados de adulterar leite presos na operação
34 Ouro Branco. Polícia Federal, 2012. Disponível em:

- 1 <[http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/marco/justica-condena-acusados-](http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/marco/justica-condena-acusados-de-adulterar-leite-presos-na-operacao-ouro-branco-1)
2 [de-adulterar-leite-presos-na-operacao-ouro-branco-1](http://www.pf.gov.br/agencia/noticias/2012/marco/justica-condena-acusados-de-adulterar-leite-presos-na-operacao-ouro-branco-1)>. Acesso em: 07 de maio
3 de 2021.
- 4 Pylypiw Jr, H. M. P., & Grether, M. T. (2000). Rapid high-performance liquid
5 chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium
6 sorbate in foods, *883*, 299–304.
- 7 Qin, J., Chao, K., & Kim, M. S. (2013). Simultaneous detection of multiple adulterants
8 in dry milk using macro-scale Raman chemical imaging. *Food Chemistry*, *138*(2–
9 3), 998–1007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.115>
- 10 Recio, I., & Lo, R. (1996). Study of the Formation of Caseinomacropetides in Stored
11 Ultra-High-Temperature-Treated Milk by Capillary Electrophoresis, *140*, 3845–
12 3848.
- 13 Rocha, R. A., Paiva, I. M., Anjos, V., Furtado, M. A. M., Bell, M. J. V. (2015).
14 Quantification of whey in fluid milk using confocal raman microscopy and artificial
15 neural network, 3559–3567. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8548>
- 16 Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M., & Shotts, M. (2016). *4 - Advances in Infrared*
17 *Spectroscopy for Food Authenticity Testing. Advances in Food Authenticity*
18 *Testing*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00004-7>
- 19 Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Colnago, L. A. (2016). Detection and quanti fi
20 cation of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-
21 NMR). *Microchemical Journal*, *124*, 15–19.
22 <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.07.013>
- 23 Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Rodriguez-saona, L. E. (2015). Rapid detection
24 and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and
25 chemometrics analysis. *Food Chemistry*, *138*(1), 19–24.
26 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.024>
- 27 Sharma, K., & Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal, (July
28 2008), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s12571-009-0048-5>
- 29 Silva, L. M. M. P. Fraude alimentar: Reconhecer a sua existência através da
30 aplicação de critérios operacionais. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de
31 Produção e Transformação Agro-Industrial) - Faculdade de Ciências e
32 Tecnologia, Universidade de Lisboa. Lisboa, p. 139. 2018.
- 33 Spink, J., Ortega, D. L., Chen, C., & Wu, F. (2017). Trends in Food Science &
34 Technology Food fraud prevention shifts the food risk focus to vulnerability.

- 1 *Trends in Food Science & Technology*, 62, 215–220.
2 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.012>
- 3 Stadler, R. H., Tran, L. A., Cavin, C., Zbinden, P., Konings, E. J. M. (2016). Analytical
4 Approaches to Verify Food Integrity: Needs and Challenges, (9), 1135–1144.
5 <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0231>
- 6 Tähkääpää, S., Maijala, R., Korkeala, H., & Nevas, M. (2015). Patterns of food frauds
7 and adulterations reported in the EU rapid alert system for food and feed and in
8 Finland, 47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.007>
- 9 Taylor, P., Amirpour, M., Arman, A., Yolmeh, A., Azam, M. A., & Moradi-, Z. (2015).
10 Food Additives & Contaminants : Part B : Surveillance Sodium benzoate and
11 potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran, (April), 37–41.
12 <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1021862>
- 13 Teixeira, L. V., Fonseca, L. M. (2008) Perfil físico-químico do soro de queijos
14 mozarela e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas
15 Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60(1), 243-250.
- 16 Tripathy, S., Ghole, A. R., Deep, K., Rama, S., Vanjari, K., & Singh, S. G. (2017). A
17 comprehensive approach for milk adulteration detection using inherent bio-
18 physical properties as “ Universal Markers ”: Towards a miniaturized adulteration
19 detection platform. *Food Chemistry*, 217, 756–765.
20 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.037>
- 21 Tsimidou, M. Z., Ordoudi, S. A., Nenadis, N., Mourtzinos, I., Wakley, T., & Hassall, A.
22 H. (2016). *sophistication and its detection prevailed in parallel in those.*
23 *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd.
24 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00010-6>
- 25 Vieira, S. M., Souza, L. M. De, França, A. S., & Oliveira, L. S. (2015). FT-MIR-PLS as
26 a promising method for rapid detection of adulteration by waste whey in raw milk.
27 *Dairy Science & Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0247-0>
- 28 Yang, R., Liu, R., Dong, G., Xu, K., Yang, Y., & Zhang, W. (2016). Spectrochimica
29 Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy correlation spectroscopy
30 for discrimination adulterated milk. *SAA*, 157, 50–54.
31 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.12.017>
- 32 Zhang, J., Zhang, X., Dedi, L., & Victor, C. (2011). Review of the current application
33 of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. *Food*
34 *Control*, 22(8), 1126–1135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.019>

- 1 Zhang, L., Zhang, X., Ni, L., Xue, Z., Gu, X., & Huang, S. (2014). Rapid identification
- 2 of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near
- 3 infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *145*, 342–348.
- 4 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.064>
- 5

1 3 OBJETIVOS

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Desenvolver um método seguro para detecção de fraude por adição de
4 soro de queijo no leite.

5

6 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7

8 Estudar os componentes do soro de queijo e as substâncias utilizadas
9 na fabricação do queijo, que podem ser utilizados para a identificação da presença
10 de soro no leite;

11 Desenvolver metodologia para a detecção de componentes que
12 identifiquem a presença de soro de queijo no leite;

13 Produzir amostras de queijo em laboratório, com diferentes tipos de
14 coalhos comercializados por supermercados e indústrias, e verificar se os
15 componentes selecionados estão presentes no soro;

16 Analisar a presença dos componentes selecionados em amostras de
17 soro fornecidas por produtores de queijo;

18 Analisar amostras de leite cru, adulterado com diferentes porcentagens
19 de soro de queijo;

20 Realizar a validação do método de acordo com ICH/ANVISA;

1 4 ARTIGO A – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A 2 DETECÇÃO DE CONSERVANTES EM LEITE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

3 RESUMO

4 Diversos alimentos são alvos de adulterações intencionais, estando o leite entre os
5 alimentos mais vulneráveis a esta prática. Os objetivos da fraude são diversos, como
6 aumento de volume, neutralização da acidez e controle de microrganismos. Para
7 controlar o crescimento microbiano no leite são utilizadas ilegalmente, diversas
8 substâncias, algumas apresentando potencial toxigênico e cancerígeno. Dentre os
9 aditivos empregados como conservantes, amplamente utilizados na indústria
10 alimentícia por sua fácil obtenção, destacam-se o benzoato de sódio e sorbato de
11 potássio, cujo uso em leite, é proibido por legislação. Assim, este estudo teve como
12 objetivo propor e validar um método com preparo simples de amostra para detectar a
13 presença dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em amostras
14 de leite. O método desenvolvido e validado atingiu as figuras de mérito seguindo os
15 critérios de parâmetros estabelecidos pela *International Conference on*
16 *Harmonization* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ICH/ANVISA). A etapa de
17 extração envolveu a diluição da amostra em acetonitrila (1:1 v/v), centrifugação,
18 sendo o sobrenadante filtrado em membrana de politetrafluoretileno 0,22 μm e
19 injetado no cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de
20 diodos (HPLC-PDA). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,204 e 0,618
21 mg L^{-1} para benzoato de sódio e 0,108 e 0,328 mg L^{-1} para sorbato de potássio
22 respectivamente. A exatidão foi calculada pela recuperação que ficou entre 92,67 e
23 99,53, sendo o pH 4,0 o selecionado como o mais adequado considerando a
24 resolução entre os conservantes. O método proposto se distingue por ser de simples
25 e rápida execução, empregar apenas um reagente no preparo da amostra e em
26 pequenas quantidades, reduzindo a toxicidade e levando ao baixo descarte de
27 substâncias poluentes, além da redução da quantidade de matéria prima utilizada e
28 consumo de energia, tornando-o mais verde de acordo com os princípios da química
29 verde. Os valores de limite de quantificação são mais baixos, tornando o método
30 proposto mais sensível, quando comparado ao método oficial, e o preparo, a
31 separação e detecção simultânea desses conservantes em curto tempo, possibilita
32 sua aplicação em rotina industrial para avaliação de fraude em amostras de leite.

33 **Palavras-chave:** Benzoato de sódio. Sorbato de potássio. Cromatografia líquida de

- 1 alta eficiência. Validação. Fraude.
- 2

ABSTRACT

Several foods are targets of intentional adulteration, being milk among the most vulnerable foods to this practice. The purposes of fraud are diverse, such as increasing volume, neutralizing acidity and controlling microorganisms. To control microbial growth in milk, several substances are illegally used, some of which have toxigenic and carcinogenic potential. Among the additives used as preservatives, widely used in the food industry because of its easy availability, sodium benzoate and potassium sorbate stand out, whose use in milk is prohibited by law. Thus, this study aimed to propose and validate a method with simple sample preparation to detect the presence of the preservatives sodium benzoate and potassium sorbate in milk samples. The developed and validated method reached the figures of merit following the parameter criteria established by the International Conference on Harmonization and the National Health Surveillance Agency (ICH/ANVISA). The extraction step involved diluting the sample in acetonitrile (1:1 v/v), centrifugation, and the supernatant being filtered on a 0.22 μm polytetrafluoroethylene membrane and injected into the high-efficiency liquid chromatograph with diode array detection (HPLC -PDA). The limits of detection and quantification were 0.204 and 0.618 mg L⁻¹ for sodium benzoate and 0.108 and 0.328 mg L⁻¹ for potassium sorbate, respectively. Accuracy was calculated by the recovery that was between 92.67 and 99.53, with pH 4.0 being selected as the most suitable considering the resolution among preservatives. The proposed method is distinguished by being simple to perform, using only one reagent in sample preparation and in small quantities, reducing toxicity and leading to low disposal of polluting substances, in addition to reducing the amount of raw material used and energy consumption, making it greener according to the principles of green chemistry. The limit of quantification values are lower, when compared to the official method, and the preparation, separation and simultaneous detection of these preservatives in a short time allows their routine application in milk samples.

29
30

Key-words: Sodium benzoate. Potassium sorbate. High Performance Liquid Chromatography. Validation. Fraud.

33

1 1 Introdução

2 A prática de adulteração ou substituição de ingredientes alimentares é
3 cada vez mais comum e evidenciada por muitos incidentes envolvendo alimentos
4 (Rodriguez-Saona, Giusti & Shotts, 2016). Inúmeros tipos de adulterações são
5 praticados no leite e seus derivados, todas de cunho criminoso, pois, segundo a
6 legislação em vigor, o leite não deve apresentar substâncias estranhas à sua
7 composição (Brasil, 2018).

8 Diversos alimentos são frequentemente adulterados com a intenção de
9 aumentar o volume, controlar a contaminação e mascarar a deterioração,
10 representando uma enorme preocupação, tanto para os órgãos de fiscalização,
11 quanto para os consumidores (Medina et al., 2019).

12 O uso de conservantes químicos em alimentos é frequente nas
13 indústrias, e permitido em vários alimentos, pois esses agentes evitam a
14 deterioração, sendo considerados como antimicrobianos por causar a inibição do
15 crescimento de microrganismos (Mota et al., 2003), evitando assim alterações
16 consideradas indesejáveis nesses produtos, além de manter o frescor, sabor, textura
17 e a aparência dos mesmos (Carocho, Morales & Ferreira, 2015; Taylor et al., 2015).
18 O ácido benzoico e o ácido sórbico e seus sais são exemplos de conservadores
19 vastamente utilizados em diversos alimentos. Porém, o uso de conservantes em leite
20 é proibido no Brasil (Brasil, 2018).

21 O Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem
22 Animal, indica a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE – do inglês HPLC)
23 para a detecção desses conservantes em amostras de leite, leite em pó, iogurte,
24 leites fermentados e queijos (Brasil, 2019). A técnica de separação utilizada pela
25 cromatografia é eficiente, podendo ser aplicada à alimentos complexos, além de ser
26 muito utilizada na detecção de substâncias estranhas (Zhang et al., 2011). O HPLC
27 permite a medição simultânea de vários compostos em uma única análise, sendo
28 uma ótima ferramenta para matrizes complexas envolvendo a matéria-prima leite,
29 pois consegue identificar e quantificar diversas moléculas. Desta forma, essa
30 ferramenta é muito importante para a determinação de autenticidade do leite e
31 derivados (Kamal & Karoui, 2015).

32 Em se tratando de técnicas analíticas para fins de separação,
33 identificação e quantificação de componentes amostrais, o HPLC se destaca como

1 uma das melhores (Kamal & Karoui, 2015), sendo vastamente utilizado em casos de
2 fraude alimentar (Tsimidou et al., 2016). Sendo assim, o presente trabalho teve
3 como objetivo de desenvolver e validar um novo método simplificado de extração e
4 detecção dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio no leite,
5 empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de
6 diodos no UV (HPLC-PDA).

7 **2 Material e métodos**

8 **2.1 Material**

9 Os padrões de benzoato de sódio, sorbato de potássio, ácido benzoico
10 e ácido sórbico foram fornecidos pela Dinâmica (São Paulo – Brasil) e os possíveis
11 interferentes (ácido láctico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico)
12 fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água ultrapura utilizada foi
13 proveniente do Sistema Milli-Q® (Millipore, Billerica, MA, EUA) e a acetonitrila grau
14 HPLC foi obtida da J.T. Baker (Avantor, México).

15 **2.2 Preparo de soluções**

16 Para o preparo do tampão fosfato foram pesados 3,0 g de fosfato de
17 sódio monobásico anidro p.a. fornecido pela Nuclear (São Paulo, Brasil) e dissolvido
18 em 900 mL de água ultrapura, sendo ajustado o para pH 4,0.

19 O benzoato de sódio (25,00 mg) e o sorbato de potássio (25,00 mg)
20 foram pesados em balança analítica e transferidos para um balão volumétrico de 25
21 mL. O conteúdo do balão foi inicialmente dissolvido com água ultrapura depois
22 levado ao volume final. Em seguida, alíquotas da solução estoque foram transferidas
23 para um balão de 100 mL e diluídas com fase móvel (acetonitrila:tampão fosfato
24 88:12, v/v) para preparar as soluções padrões de concentrações de 0,10; 0,50; 1,00;
25 2,50; 5,00; 7,50; 10,00; 25,00; 50,00 e 100,00 mg L⁻¹ empregadas nas curvas
26 analíticas.

27 **2.3 Preparo de amostra**

1 Para a extração dos conservantes diluiu-se a amostra a ser analisada
2 com acetonitrila na proporção 1:1 (v/v), seguida por homogeneizador vórtex por um
3 minuto e centrifugação à 10.000 rpm (Força G: 480) em centrífuga de microtubos
4 (Fisher Scientific) por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em
5 membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE) 0,22 µm (Millipore® – Millex,
6 Billerica, MA, EUA) em frasco âmbar (*vials*) de 2,0 mL (Agilent, Walsdorf, Alemanha).
7 Para a utilização da amostra em dias distintos, a mesma foi acondicionada em
8 refrigerador a aproximadamente 4°C.

9 **2.4 Equipamentos e condições cromatográficas**

10 A determinação e a quantificação dos conservantes extraídos foram
11 realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Shimadzu, Quioto,
12 Japão), composto por bomba LC-20AT, com sistema gerenciador de gradiente e
13 degaseificador DGU-20A e injetor automático SIL-20AC com amostrador de 70
14 *vials*. A coluna utilizada foi uma coluna C18 – Luna (250 mm × 4,6 mm, 5,0 µm,
15 Phenomenex, Califórnia, EUA), mantida a 40 °C em um forno CTO-20A e a detecção
16 foi feita pelo detector de Arranjo de diodos no UV – PDA, com os módulos
17 gerenciados pela controlada CBM-20A, comandados pelo software LC-Solution
18 (Versão 1.21). Utilizou-se como fase móvel a acetonitrila e o tampão fosfato 82:18
19 (v/v) em uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, utilizando-se um tempo de corrida de 25 min
20 por amostra. O volume de injeção de cada amostra foi de 10,0 µL. Os comprimentos
21 de onda máximos selecionados para a determinação de benzoato de sódio e sorbato
22 de potássio foram 225 e 255 nm, respectivamente (Gören et al., 2015).

23 **2. 5 Parâmetros da validação**

24 O método cromatográfico (HPLC-PDA) foi validado segundo critérios
25 preconizados pelo *International Conference on Harmonization (ICH)* (ICH, 2018) e
26 Resolução - RE nº 166 (ANVISA, 2017) avaliando-se os parâmetros de:
27 especificidade e seletividade, linearidade e faixa dinâmica de trabalho, precisão
28 (repetitividade – intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), exatidão
29 (recuperação), limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

30 A seletividade e a especificidade do método proposto foi demonstrada,

1 primeiramente pela sobreposição dos cromatogramas de uma amostra de leite cru
2 sem adição de padrão, tomada como branco analítico; uma amostra de leite cru com
3 adição de benzoato de sódio (*spiked*); e outra contendo sorbato de potássio (*spiked*)
4 na concentração de 5,0 mg L⁻¹, como apresentada nos cromatogramas e espectros
5 de absorvância nos comprimentos de onda máximo de 225 nm e 255 nm,
6 respectivamente (Figura 1 (a), (b), (c) e (d)). Também foram testados outros analitos
7 que poderiam atuar como possíveis interferentes neste estudo de seletividade como
8 os ácidos produzidos pelas bactérias presentes no leite, como os ácidos láctico e
9 acético, e outros ácidos como ascórbico, cítrico e málico, na concentração de 10,0
10 mg L⁻¹.

11 A linearidade do método foi verificada pela construção de curvas
12 analíticas de 0,10 a 1000,00 mg L⁻¹, fixadas em seus respectivos comprimentos de
13 onda máximos de 255 e 225 nm, realizadas em triplicata para os conservantes
14 benzoato de sódio e sorbato de potássio. A faixa linear de trabalho foi definida nas
15 concentrações de 0,50; 1,00; 2,50; 5,00; 7,50; 10,00 e 25,00 mg L⁻¹ para ambos os
16 conservantes. As curvas analíticas (Eq. 1 e 2) obtidas para ambos os conservantes
17 foram construídas utilizando os modelos lineares (Área x Concentração) (Figura 3 (a)
18 e (b)) e expressas de forma concatenada.

19

$$20 \quad [benzoato](mg L^{-1}) = \frac{(Area) - 2342,2}{19089} \quad Eq. (1)$$

21

22

$$23 \quad [sorbato](mg L^{-1}) = \frac{(Area) + 17958}{47051} \quad Eq. (2)$$

24

25

26 A precisão intra-dia foi determinada pela repetibilidade de seis injeções
27 sucessivas de uma amostra de leite cru, a precisão intermediária foi realizada em 2
28 dias distintos para as concentrações de benzoato de sódio e sorbato de potássio
(1,00; 7,50; e 25,00 mg L⁻¹).

29

30 A exatidão foi calculada por meio da recuperação realizada em
31 triplicata ($n=3$), determinada pela adição dos padrões dos conservantes diretamente
32 na matriz do leite, antes e após o processo de extração, sendo que, as
concentrações adicionadas após o processo de extração foram consideradas como

1 recuperação correspondente a 100%. Foram adicionados três níveis de
2 concentração para benzoato de sódio e sorbato de potássio, 1,00; 10,00 e 25,00 mg
3 L⁻¹, sendo eles baixo (*R1*), médio (*R2*) e alto (*R3*), respectivamente.

4 Os limites de detecção e o limite de quantificação foram calculados
5 através da relação entre o desvio padrão do intercepto da curva de analítica e sua
6 inclinação, usando o fator multiplicativo sugerido pela norma, de acordo com as
7 Equações 3 e 4.

8

$$LD = \frac{DP_0 \times 3}{IC} \quad Eq.3$$

$$LQ = \frac{DP_0 \times 10}{IC} \quad Eq.4$$

9

10

11 Em que:

12 *IC* é a inclinação da curva13 *DP₀* é o desvio padrão do intercepto com eixo *y* das 3 curvas analíticas construídas
14 em triplicata.

15 A robustez foi avaliada quanto à capacidade do método proposto de
16 resistir às variações de proporção de fase móvel e temperatura. Para isto, variou-se
17 a concentração da fase móvel em diferentes proporções de acetonitrila e tampão
18 fosfato em pH 4,0, variando-se a composição da fase móvel em ± 1% e a
19 temperatura da coluna em ± 1,0 °C.

20 Realizou-se, ainda, um estudo de pH para definição do melhor valor de
21 pH para a fase móvel. Foram utilizados os pH's 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0.

22 **3. Resultados**

23 **Validação do método por HPLC – PDA**

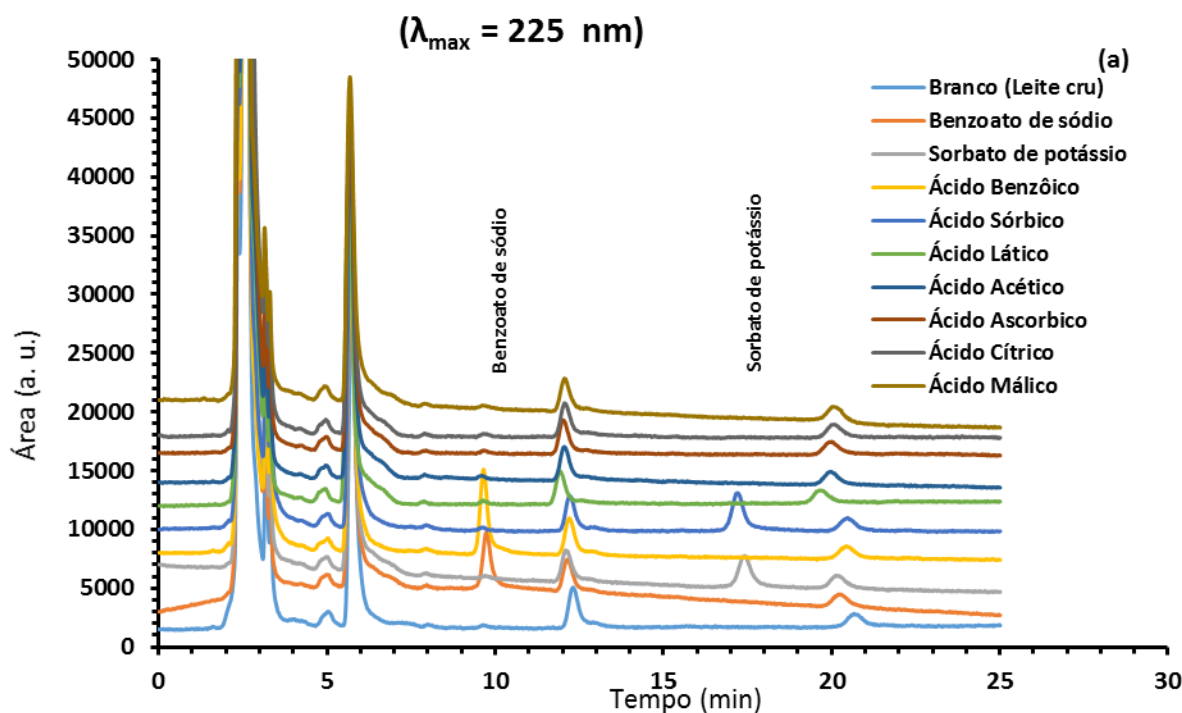
24 ***Especificidade e seletividade***

25 Observando a sobreposição dos cromatogramas (Figura 1(a)), o
26 método cromatográfico mostrou-se eficiente na separação do benzoato de sódio
27 ($\lambda_{\max} = 225$ nm) e do sorbato de potássio ($\lambda_{\max} = 255$ nm), tendo um tempo de

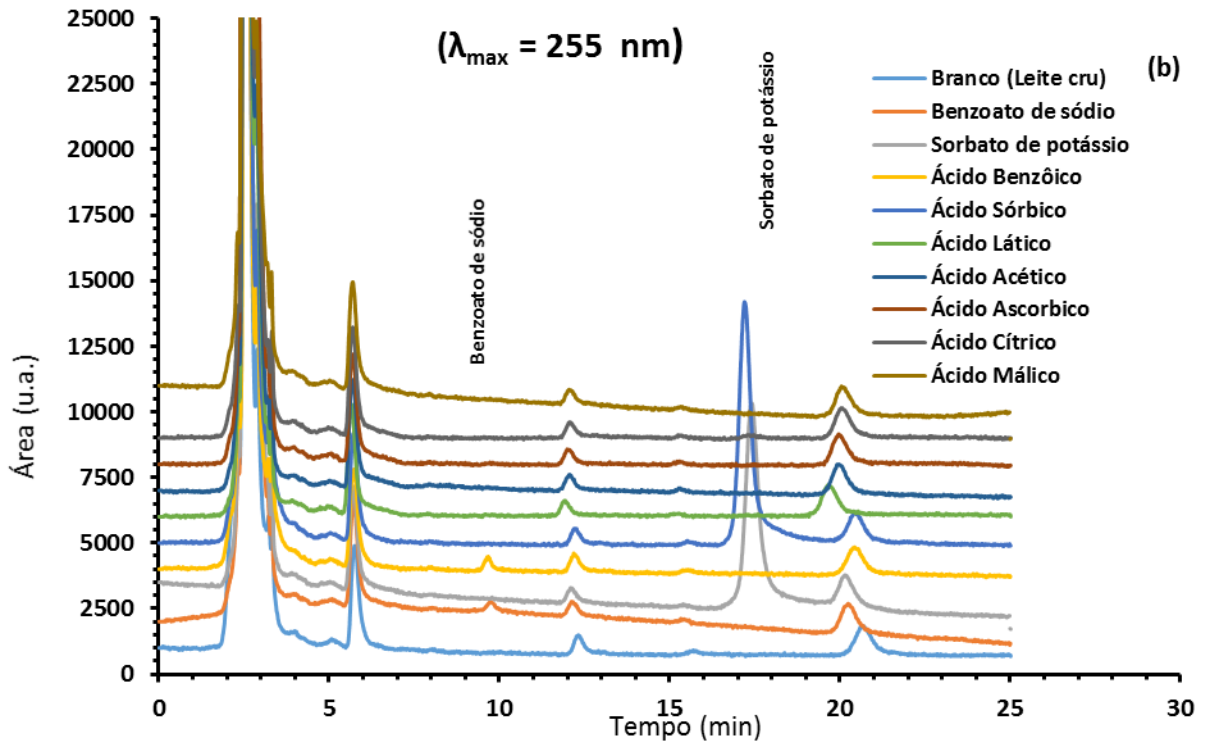
1 retenção de (TR) de 9,81 minutos e 17,37 minutos, respectivamente. Na análise de
 2 possíveis interferentes, os únicos analitos que tiveram os mesmos tempos de
 3 retenção foram suas formas protonadas, que são seus respectivos ácidos, ácido
 4 benzoico e sórbico que apresentam os ânions em comum. Já para os demais
 5 compostos como o ácido láctico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido cítrico e ácido
 6 málico, o método não apresentou sinais significativos nessas concentrações (10,0
 7 mg L⁻¹).

8

9 **Figura 1.** Seletividade e especificidade do método cromatográfico HPLC-PDA para
 10 detecção do benzoato de sódio e sorbato de potássio em leite, empregando o leite
 11 cru sem adição de padrão como o branco analítico e com a adição de outros
 12 possíveis interferentes como ácido láctico, acético, ascórbico, cítrico e málico, nos
 13 comprimentos de ondas máximos de absorvância **(a)** 225 nm e **(b)** 255 nm. Espectro
 14 de varredura do **(c)** benzoato de sódio com comprimento de onda $\lambda_{\text{max}} = 225$ nm e
 15 **(d)** sorbato de potássio com comprimento de onda $\lambda_{\text{max}} = 255$ nm

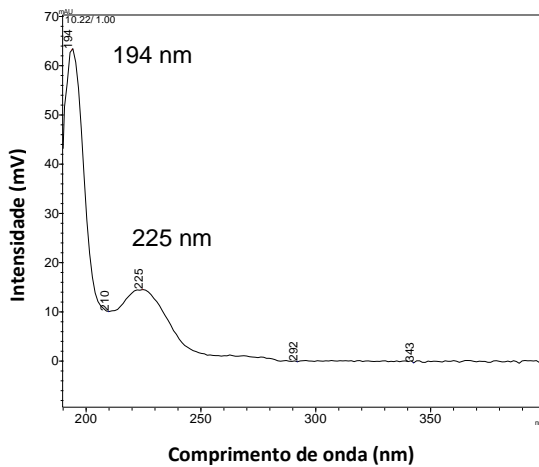


16



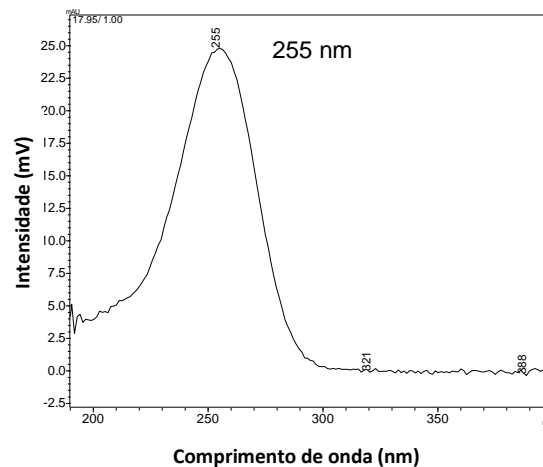
1
2
3

(c) Espectro de varredura do benzoato de sódio



4

(d) Espectro de varredura do sorbato de potássio



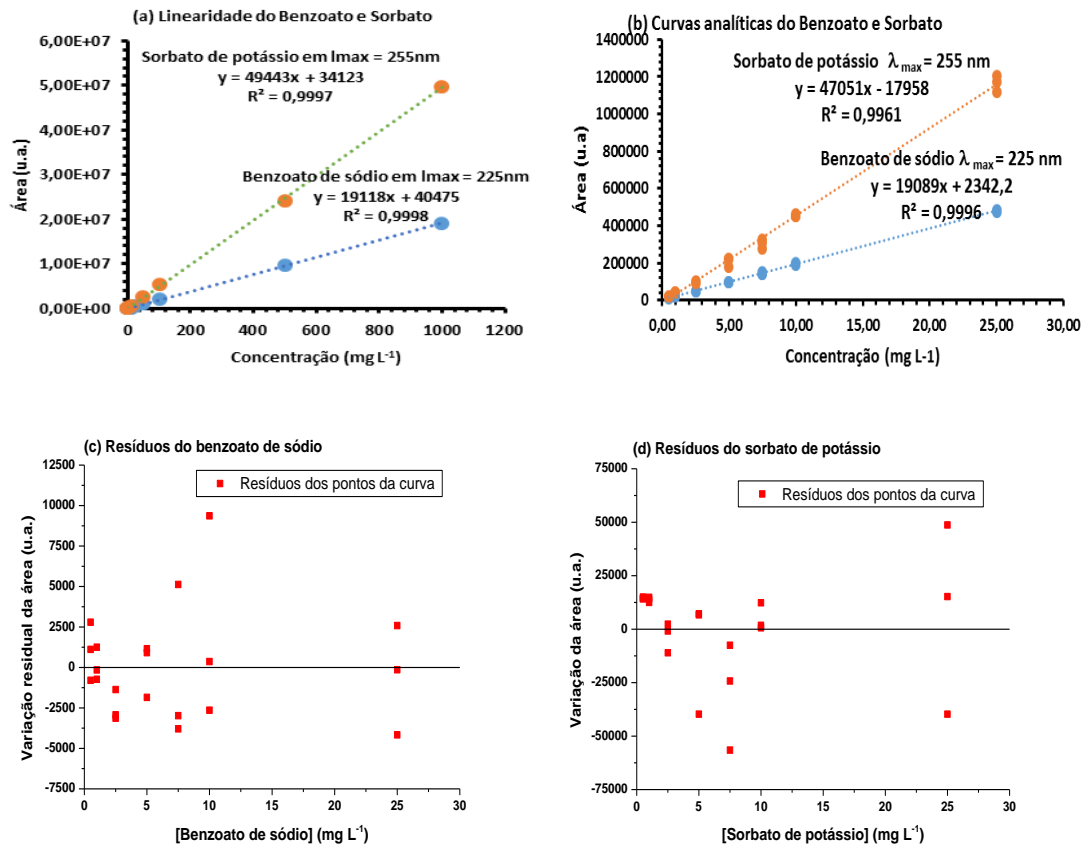
5 Linearidade

6 Pela análise das Equações 1 e 2 e da Figura 2 (a) e (b), o método
7 analítico foi considerado linear de 0,10 a 1000,00 mg L⁻¹, englobando a faixa de
8 trabalho escolhida. O valor do coeficiente de determinação $R^2 > 0,99$ demonstra que os
9 resultados são diretamente proporcionais à concentração dos analitos nas amostras,
10 dentro de um intervalo especificado, apontando linearidade do método. Pode-se
11 observar também que os resíduos para ambos os analitos (Figura 2 (c) e (d))
12 apresentaram-se de forma aleatorizada em torno da curva analítica, não

1 apresentando tendências.

2

3 **Figura 2. (a)** Linearidade e **(b)** curvas analíticas e faixa de trabalho do método
 4 desenvolvido para os padrões dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de
 5 potássio em leite cru. (c) Gráfico de resíduos do benzoato de sódio e (d) gráfico de
 6 resíduos do sorbato de potássio



7

8

9

10 **Precisão**

11 Os resultados da precisão (intra-dia) e precisão intermediária (inter-
 12 dias) estão apresentados na Tabela 1. Os valores do desvio padrão relativo (DPR)
 13 foram menores que 5,0 % indicando que o método proposto é preciso, e houve
 14 concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo.

15

16 **Exatidão**

1 A recuperação dos analitos variou de aproximadamente 92,67% a
 2 99,53% (Tabela 1), demonstrando a exatidão do método, considerando que de
 3 acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC 166/2017(ANVISA, 2017)
 4 e *International Conference on Harmonization* (ICH, 2018) essa pode variar de 80 a
 5 120%.

6
 7 **Tabela 1.** Parâmetros da validação do método proposto para detectar fraude por
 8 adição de soro de queijo em leite, envolvendo a extração e determinação por HPLC-
 9 PDA dos conservantes remanescentes benzoato de sódio e sorbato de potássio
 10 proveniente dos coagulantes empregados na fabricação do queijo (n = 3)

		[benzoato de sódio] (mg L ⁻¹) ± DP	[sorbato de potássio] (mg L ⁻¹) ± DP
Precisão Intermediária	Dia 1 e 2 (1,00 mg L ⁻¹) DPR(%)	0,98 ± 0,02 2,21	1,03 ± 0,03 2,49
	Dia 1 e 2 (7,50 mg L ⁻¹) DPR(%)	7,45 ± 0,07 0,88	7,41 ± 0,25 3,39
	Dia 1 e 2 (25,00 mg L ⁻¹) DPR(%)	24,92 ± 0,12 0,47	25,09 ± 0,13 0,52
		(%)	(%)
Exatidão	R ₁ (1,00 mg L ⁻¹)	99,53	93,90
	R ₂ (10,00 mg L ⁻¹)	98,22	96,18
	R ₃ (25,00 mg L ⁻¹)	97,20	92,67

11 DPR: Desvio padrão relativo. R₁: recuperação em nível baixo; R₂: médio; R₃: alto

12 **Limite de detecção e quantificação**

13 Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o benzoato de
 14 sódio e sorbato de potássio, calculados respectivamente pela Equações 3 e 4 foram
 15 de 0,204 e 0,618 mg L⁻¹ para benzoato de sódio e 0,108 e 0,328 mg L⁻¹ para sorbato
 16 de potássio (Tabela 2).

17
 18 **Tabela 2.** Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de benzoato de
 19 sódio e sorbato de potássio pelo método proposto

	Curva analítica	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
[Benzoato] (mg L⁻¹)	Área= 19089·[benzoato] – 2342,2	0,204	0,618
[Sorbato] (mg L⁻¹)	Área= 47051·[sorbato] – 17958,0	0,108	0,328

1 **Robustez**

2 O tempo de retenção (TR) para ambos os analitos variou em torno de
 3 11,0 % em relação às modificações das proporções de fase móvel, e variações
 4 foram inferiores à 1,80 % em relação às variações da temperatura (Tabela 3). Já
 5 com relação à área, obteve-se variações <5,50 % para as modificações de fase
 6 móvel e <1,85 % para a temperatura de forno. Nenhuma das variações nos
 7 parâmetros analisados inviabilizou a utilização do método. Entretanto, proporções
 8 inferiores a 11:89, mostraram falta de simetria de pico e área inferior em relação a
 9 proporção 12:88, ou superiores a 13:87, em que se observou a aproximação dos
 10 dois padrões utilizados, indicando o início de uma coeluição entre si ou com outros
 11 compostos presentes no leite. Desta forma, o método pode ser considerado robusto
 12 em situações de variações de proporção de fase móvel entre $\pm 1\%$ e temperatura \pm
 13 1,0 °C, sendo capaz de resistir a essas pequenas variações nesses parâmetros
 14 analíticos.

15

16 **Tabela 3.** Robustez do método cromatográfico para detecção dos conservantes
 17 benzoato de sódio e sorbato de potássio quanto às variações de proporção de fase
 18 móvel e temperatura de forno

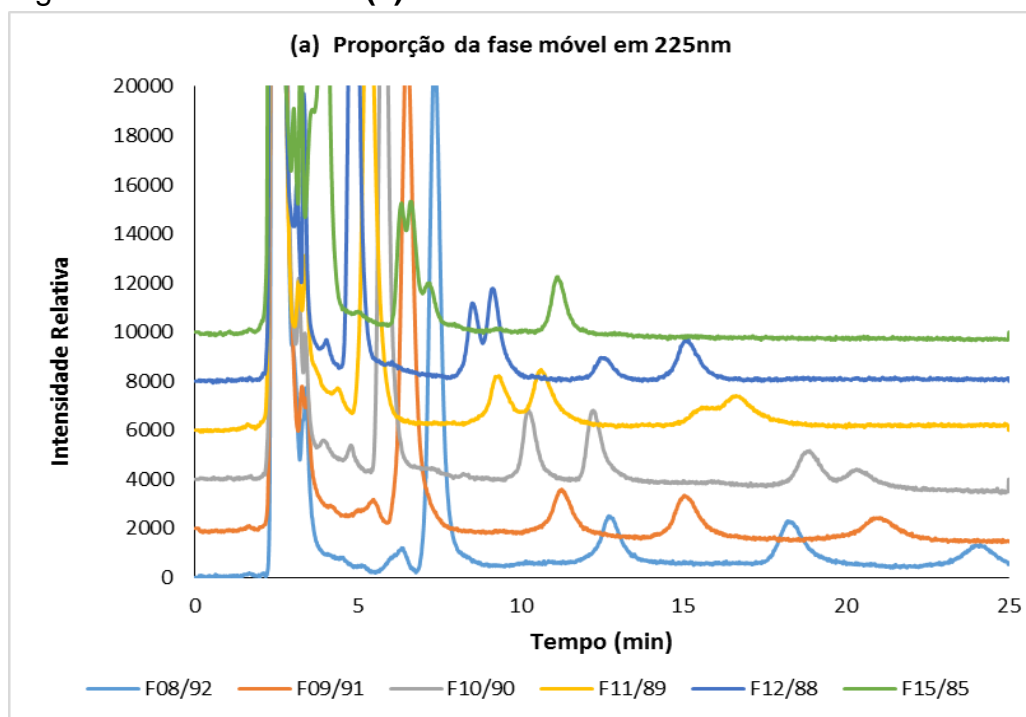
		<i>TR</i>	<i>AREA</i>
Robustez	Proporção fase móvel ($\pm 1,0\%$)	< 11,0%	<5,50 %
	Temperatura ($\pm 1,0$ °C)	<1,80%	<1,85 %

19 TR: Tempo de retenção.

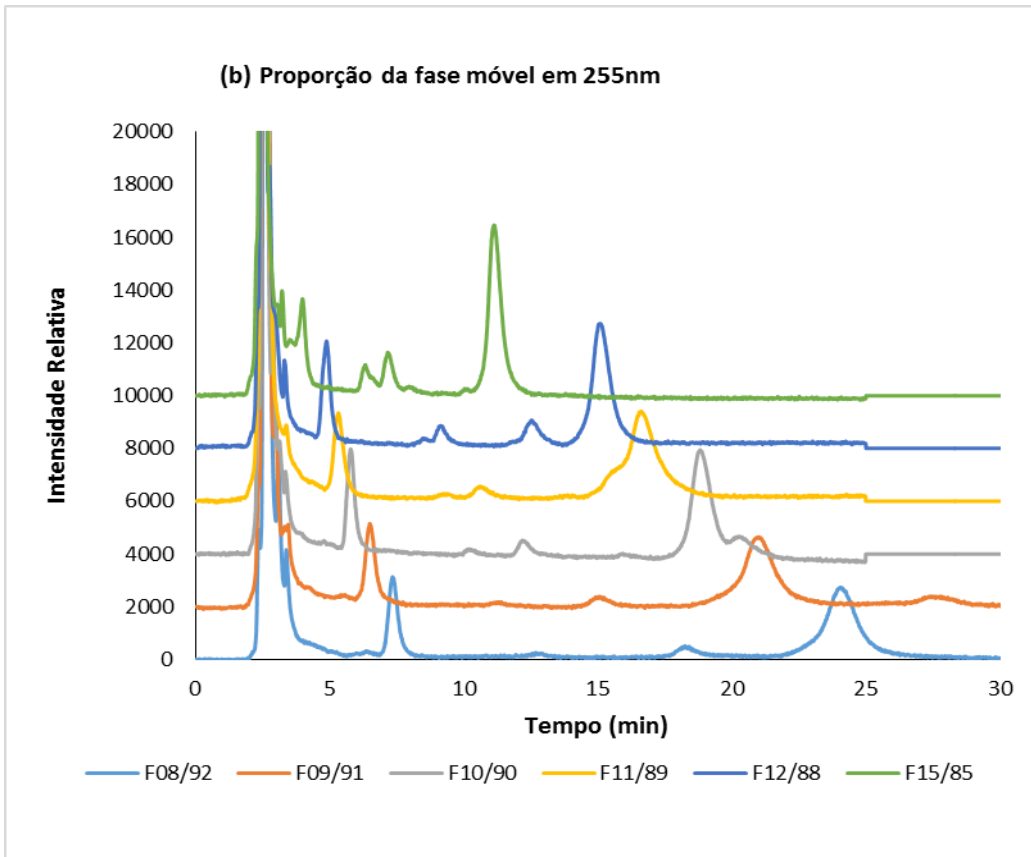
20

21

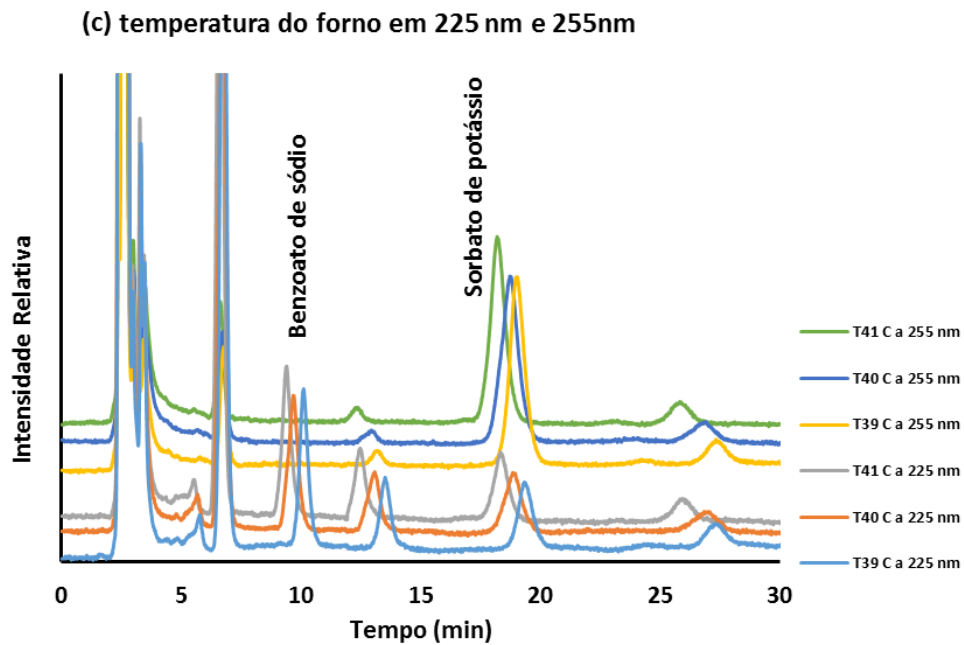
1 **Figura 3.** Cromatogramas do método proposto avaliando-se a robustez pela
2 variação em distintas proporções na composição da fase móvel (acetonitrila(ACN):
3 tampão fosfato(TP) em pH 4.0) para amostra de leite com adição dos padrões de
4 benzoato de sódio e sorbato de potássio a $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ no comprimento de onda de
5 225 nm **(a)**; em 255 nm **(b)**; e cromatogramas da avaliação da robustez do método
6 cromatográfico com relação à variação da temperatura da coluna para amostra de
7 leite com adição dos padrões de benzoato de sódio e sorbato de potássio a $10,00$
8 mg L^{-1} em 225 e 255 nm **(c)**



9



1
2



3

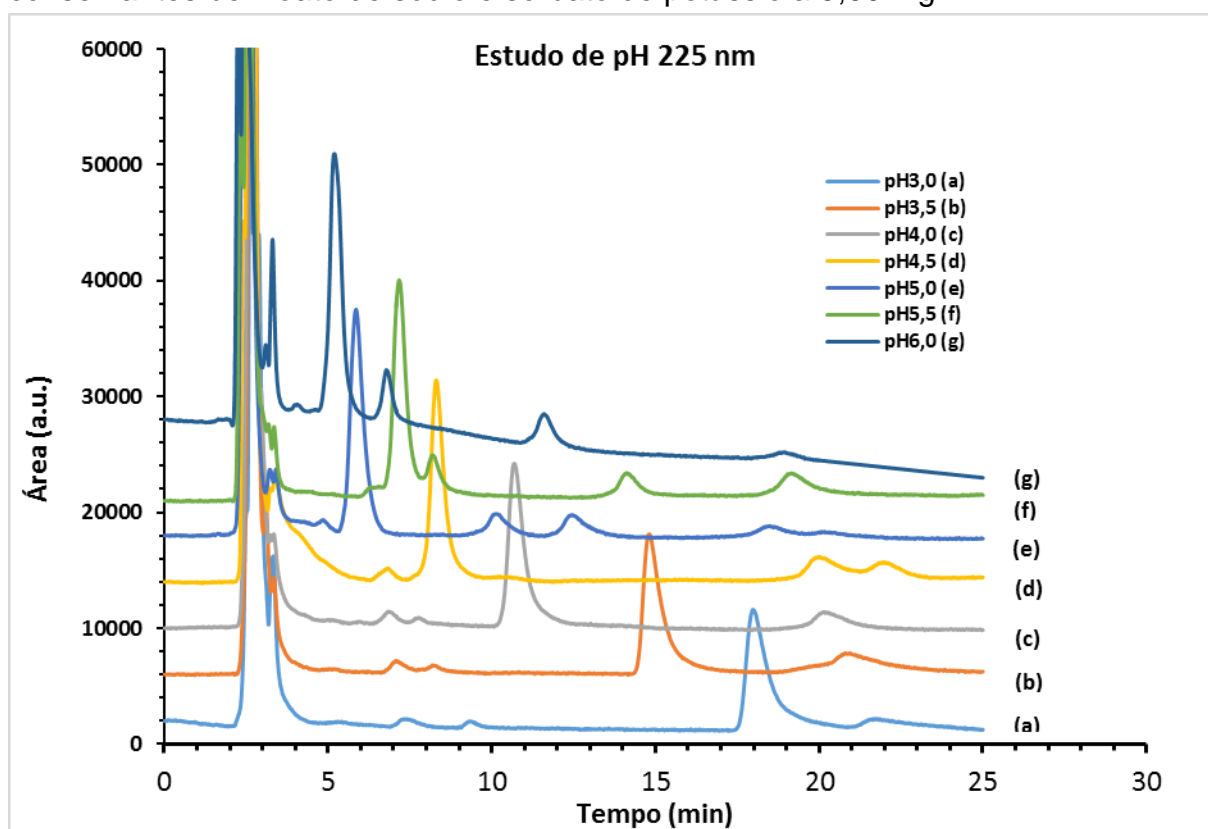
4 *Estudo do pH*

5

Para o desenvolvimento do método houve a necessidade de se realizar

1 um estudo do pH da fase móvel, visto que ocorriam alterações significativas nos
2 tempos de retenção dos analitos, conforme alterava-se o pH. O estudo teve como
3 objetivo encontrar o melhor pH para o método proposto, considerando a melhor
4 resolução entre os picos dos conservantes de interesse benzoato de sódio e sorbato
5 de potássio nas concentrações de 5,00 mg L⁻¹. Diferentes valores de pH foram
6 estudados variando-se de 3,0 a 6,0 com intervalo de 0,5 como apresentado na
7 (Figura 4).

8 **Figura 4.** Separação cromatográfica em função do pH da fase móvel para os
9 conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio a 5,00 mg L⁻¹



10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

O estudo do pH indicou que em valores inferiores a 4,0 os analitos
coeluíram com um pico não identificado na própria matriz, que pôde ser observado
com cada branco analítico. O mesmo foi observado em pH 4,5, em que o sorbato
apresentou uma coeluição com um segundo pico desconhecido. O pH 4,0 foi o que
apresentou melhor resultado e com boa separação (resolução > 2), sendo este
selecionado para a continuidade do estudo.

1 4. Discussão

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

A ISO 9231 (2008), determina o método oficial para detecção do ácido benzoico e benzoatos e ácido sórbico e sorbatos em leite e derivados através de HPLC (Brasil, 2019). Esse método utiliza grande quantidade e variedade de reagentes, bem como, um maior tempo para execução, na etapa de extração da amostra. O método proposto neste trabalho, nesta mesma etapa, utiliza a acetonitrila como único reagente, e leva um tempo menor para finalização. O Quadro 1, mostra uma comparação entre o método oficial e o aqui proposto, considerando reagentes, volumes e equipamentos utilizados, bem como o tempo de preparo da amostra e a corrida em HPLC, fase móvel e limite de quantificação proposto.

Gören et al. (2015) utilizaram o HPLC em sua pesquisa de conservantes em alimentos e bebidas, mostrando a eficiência do método testado. Esses autores utilizaram os mesmos comprimentos de ondas utilizados neste estudo (255 e 225 nm) e sua fase móvel consistia de tampão de acetato de amônio e acetonitrila (72:28, v/v).

Pylypiw Jr & Grether (2000) pesquisaram empregando o HPLC-PDA, os mesmos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio em diversos alimentos, como suco de maçã, suco de cranberry, suco de uva, manteiga de amendoim, molho de soja entre outros, utilizando como fase móvel o tampão acetato de amônia e acetonitrila (90:10 v/v), com o melhor pH em 4,2. Em seu preparo de amostra utilizou a fase móvel como solvente filtrando em membrana de nylon 0,45 µm. Foi obtida uma maior sensibilidade para este método utilizando os comprimentos de onda máximos de 225 nm e 255 nm, para benzoato de sódio e sorbato de potássio, respectivamente, sendo encontrados valores de recuperação entre 82% e 96% e apresentado limites de detecção de 10,0 mg L⁻¹ para ambos os analitos, mais de 10 vezes maiores que no método proposto.

Quadro 1. Comparativo, em relação aos reagentes, equipamentos, processos e tempo de duração, entre o método proposto neste trabalho e o método oficial para a quantificação de conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio empregando HPLC

	Método proposto	Método ISO 9231 (2008)
Método validado		
Volume amostra	1,0 mL	100 a 3000 mg
Etapa de extração	1,0 mL de amostra e 1,0	Hidróxido de Sódio 25 mL

	mL Acetonitrila (ACN) Homogeneizar vórtex (1 min) Centrífuga de microtubos (10 min – 10.000 rpm) Filtrar membrana PTFE 0,22 µm	Ácido Sulfúrico Hexacianoferrato de Potássio 2 mL Acetato de Zinco 2 mL Metanol 40 mL Banho ultrassônico ou Banho maria 70°C (15 minutos) pHmetro Filtro hidrofílico 0,45 µm
Tempo extração (min)	12	60
Composição da Fase Móvel (FM)	Acetonitrila (12% vol.) Tampão Fosfato (88% vol.) pHmetro	Metanol (10% vol.) Tampão Fosfato (90% vol.) pHmetro Filtro hidrofílico 0,45 µm
Vazão da FM (mL/min)	1,0	1,2
Tempo de corrida no HPLC(min)	25	10
Vol. Injeção (µL)	10	5 a 20
Benzoato de sódio ($\lambda_{\text{máx}}$ - nm)	225	227
Sorbato de potássio ($\lambda_{\text{máx}}$ - nm)	255	250
LQ benzoato	>0,618 mg/L	>5 mg/kg
LQ sorbato	>0,328 mg/L	>5 mg/kg

1 $\lambda_{\text{máx}}$: Comprimento de onda máximo utilizado para detecção; LQ: Limite de quantificação.

2 O método aqui proposto, oferece maior simplicidade e facilidade na
3 execução da prova e menor custo quando comparado ao método oficial (Brasil,
4 2019. O preparo da amostra não necessita de aquecimento, utiliza apenas um
5 reagente (ACN) para a etapa de extração, reduzindo o descarte de diversos
6 reagentes, que o torna mais verde, e facilita a manipulação no procedimento. O
7 método proposto também demanda menor tempo total de execução (37 min contra
8 70 min do oficial), considerando as etapas de extração e corrida de amostra. O limite
9 de quantificação também é melhor no método proposto, sendo o limite para o
10 benzoato de sódio 8 vezes menor e para o sorbato de potássio 15 vezes menor,
11 quando comparado ao método oficial, mostrando maior sensibilidade do método
12 proposto, e possibilitando a quantificação em amostras contendo baixas quantidades
13 dos analitos em questão.

1 **5 Conclusão**

2 O método de HPLC-PDA desenvolvido e validado apresentou
3 seletividade e especificidade sendo eficiente na separação e detecção simultânea do
4 benzoato de sódio e sorbato de potássio em amostras de leite experimentalmente
5 fraudadas, nos respectivos comprimentos de onda máximos de 225 nm e 255 nm,
6 com baixos limites de detecção e quantificação, além de boa exatidão, com altas
7 taxas de recuperação. O preparo de amostra é simples e de rápida realização, utiliza
8 baixo volume do solvente acetonitrila, o que reduz o custo e a quantidade de
9 descarte de resíduos, simplificando e dando agilidade ao método. O tempo total
10 utilizado para cada análise, incluindo o preparo da amostra e a execução
11 cromatográfica, é de aproximadamente 37 minutos, podendo ser indicado para
12 análises de rotina.

13 **Referências**

- 14 ANVISA (2017). Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras
15 providências. Resolução RE n. 166, 1 – 21, 24 de julho de 2017.
- 16 Beloti, Vanerli. Leite: Obtenção, inspeção e qualidade. Editora Planta, Londrina,
17 2015.
- 18 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº
19 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a
20 identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru
21 refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da
22 União, Brasília, 2018.
- 23 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos
24 oficiais para análise de alimentos de origem animal. Ministério da Agricultura,
25 Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2. ed. – Brasília
26 : MAPA, 2019.
- 27 Caroch, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Trends in Food Science &
28 Technology Natural food additives: Quo vadis?, 45, 284–295.
29 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- 30
- 31 Gören, A. C, Bilsel, G., Simsek, A., Bilsel, M., Akçadag, F., Topal, K., Ozgen, H.

- 1 (2015). HPLC and LC – MS / MS methods for determination of sodium benzoate
2 and potassium sorbate in food and beverages : Performances of local accredited
3 laboratories via proficiency tests in Turkey, 175, 273–279.
4 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.094>
- 5 International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R2)/ Q14: Analytical Procedure
6 Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation, US FDA Federal
7 Register, Nov 2018.
- 8 Jia, W., Ling, Y., Lin, Y., Chang, J., & Chu, X. (2014). Analysis of additives in dairy
9 products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass
10 spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1336, 67–75.
11 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.028>
- 12 Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Trends in Food Science & Technology Analytical
13 methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and
14 detecting the adulteration of dairy products : A review. *Trends in Food Science &*
15 *Technology*, 46(1), 27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- 16 Medina, S., Pereira, J. A., Silva, P., Perestrelo, R., & Câmara, J. S. (2019). Food
17 fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety. *Food*
18 *Chemistry*, 278(November 2018), 144–162.
19 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.046>
- 20 Mota, F. J. M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Cunha, S. C., Beatriz, M., & Oliveira, P. P.
21 (2003). Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic
22 acids in foodstuffs, 82, 469–473. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00116-](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00116-X)
23 X
- 24 Nascimento, C. F., Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Rocha, F. R. P. (2017).
25 Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry*, 221,
26 1232–1244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>
- 27 Pylypiw Jr, H. M. P., & Grether, M. T. (2000). Rapid high-performance liquid
28 chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium
29 sorbate in foods, 883, 299–304.
- 30 Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M., & Shotts, M. (2016). 4 - *Advances in Infrared*
31 *Spectroscopy for Food Authenticity Testing. Advances in Food Authenticity*
32 *Testing*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00004-7>
- 33 Taylor, P., Amirpour, M., Arman, A., Yolmeh, A., Azam, M. A., & Moradi-, Z. (2015).
34 Food Additives & Contaminants : Part B : Surveillance Sodium benzoate and

- 1 potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran, (April), 37–41.
2 <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1021862>
- 3 Tsimidou, M. Z., Ordoudi, S. A., Nenadis, N., Mourtzinos, I., Wakley, T., & Hassall, A.
4 H. (2016). *sophistication and its detection prevailed in parallel in those.*
5 *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd.
6 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00010-6>
- 7 Zhang, J., Zhang, X., Dediu, L., & Victor, C. (2011). Review of the current application
8 of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. *Food*
9 *Control*, 22(8), 1126–1135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.019>
- 10

1 **5 ARTIGO B – MÉTODO ALTERNATIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE LEITE**
2 **ADULTERADO COM SORO DE QUEIJO, PELA DETECÇÃO DE**
3 **CONSERVANTES DO COAGULANTE**

4 **RESUMO**

5 A adição de soro de queijo ao leite fluido, é uma fraude relativamente frequente,
6 para promover o aumento no volume, e conseqüentemente o aumento do lucro com
7 a produção, e é de difícil detecção pelos sistemas de fiscalização e controle de
8 qualidade. A maioria dos métodos utilizados para a detecção do soro de queijo no
9 leite se concentram na busca pelo caseinomacropéptido (CMP), que é liberado pela
10 ação da quimosina na k-caseína, durante fabricação do queijo. Porém, uma
11 porcentagem de amostras pode apresentar resultados falso-positivos, devido à
12 presença do pseudo-caseinomacropéptido (pseudo-CMP), que pode ser formado
13 no leite líquido devido à ação de proteases produzidas por microrganismos
14 psicrótróficos, que se diferencia do CMP pela presença de apenas um aminoácido.
15 Entretanto, durante a produção do queijo, são utilizados coagulantes, que possuem
16 conservantes em sua formulação, como o benzoato de sódio e o sorbato de
17 potássio, cujos resíduos permanecem no soro de queijo. Desta forma, o presente
18 estudo tem como objetivo aplicar o método do HPLC-PDA desenvolvido e validado
19 em estudo anterior, para detectar esses conservantes em leite e identificar a fraude
20 por adição de soro de queijo. Pesquisou-se a presença dos conservantes em 30
21 amostras de soro de queijo, sendo 11 delas obtidas em laboratório com a utilização
22 de coagulantes distintos e 19 amostras obtidas de queijarias comerciais e
23 artesanais, bem como a detecção dessa fraude em amostras de leite
24 experimentalmente adulteradas com a adição de 50%, 20%, 10%, 5% e 1%, das
25 amostras de soro. Avaliou-se também o índice crioscópico, o pH, além da
26 quantificação dos conservantes através de HPLC-PDA. Na avaliação do índice
27 crioscópico, as amostras de leite fraudadas com 10% de soro de queijo, tiveram
28 valores médios de $-0,546^{\circ}$ H e de 6,80 para o pH, valores considerados normais
29 para o leite. Já para a detecção dos conservantes nas amostras, 93,10% das
30 amostras de soro avaliadas apresentaram o conservante benzoato de sódio e três
31 delas também apresentaram o sorbato de potássio. O método foi aplicado com
32 sucesso uma vez que permitiu detectar a presença dos mesmos conservantes no

1 coagulante avaliado, no soro de queijo obtido com o uso do coagulante em questão
2 e no leite fraudado com diferentes porcentagens de soro. Desta forma, o método
3 proposto apresenta uma abordagem inédita e é uma importante ferramenta
4 alternativa para a pesquisa de adulterações do leite por adição de soro de queijo a
5 ser utilizada no controle de qualidade e de fiscalização.

6
7 **Palavras-chave:** HPLC. Caseinomacropéptídeo. Benzoato de sódio. Sorbato de
8 potássio. Soro de queijo.

9

ABSTRACT

1
2 The addition of cheese whey to fluid milk is a relatively frequent fraud, to promote an
3 increase in volume, and consequently an increase in production profit, and is difficult
4 to detect by inspection and quality control systems. Most methods used to detect
5 cheese whey in milk focus on the search for caseinomacropptide (CMP), which is
6 released by the action of chymosin on k-casein, during cheese making. However, a
7 percentage of samples may present false-positive results due to the presence of
8 pseudo-caseinomacropptide (pseudo-CMP), which can be formed in liquid milk due
9 to the action of proteases produced by psychrotrophic microorganisms, which differs
10 from CMP by the presence of just one amino acid. However, during the production of
11 cheese, coagulants are used, which have preservatives in their formulation, such as
12 sodium benzoate and potassium sorbate, whose residues remain in the cheese
13 whey. Thus, this study aims to apply the HPLC-PDA method developed and validated
14 in a previous study, to detect these preservatives in milk and identify fraud by adding
15 cheese whey. The presence of preservatives was investigated in 30 samples of
16 cheese whey, 11 of which were obtained in the laboratory using different coagulants
17 and 19 samples obtained from commercial and artisanal cheese factories, as well as
18 the detection of this fraud in milk samples experimentally adulterated with the
19 addition of 50%, 20%, 10%, 5% and 1% of the serum samples. Analyzes were
20 performed using cryoscopic index, pH and quantification of preservatives using
21 HPLC-PDA. In the evaluation of the cryoscopic index, the milk samples rigged with
22 10% cheese whey had mean values of -0.546°H and 6.80 for pH, values considered
23 normal for milk. For the detection of preservatives in the samples, 93.10% of the
24 whey samples evaluated presented the preservative sodium benzoate and three of
25 them also presented potassium sorbate. The method was successfully applied since
26 it allowed detecting the presence of the same preservatives in the evaluated
27 coagulant, in the cheese whey obtained with the use of the coagulant in question and
28 in the milk rigged with different percentages of whey. Thus, the proposed method
29 presents an unprecedented approach and is an important alternative tool for
30 researching milk adulteration by adding cheese whey to be used in quality control
31 and inspection.

32 **Key-words:** HPLC. Caseinomacropptide. Sodium benzoate. Potassium sorbate.
33 Whey.

1 1 Introdução

2 A fraude nos alimentos pode causar uma série de implicações, além de
3 perdas econômicas, pode ainda acarretar enormes riscos à saúde pública (Sharma
4 & Paradakar, 2010; Tähkäpää et al., 2015; Nascimento et al., 2017; Abbas et al.,
5 2018), e também ocasionar nos consumidores a perda de confiança pela marca e
6 produto . Moore, Spink & Lipp. (2012), em sua revisão sobre os alimentos mais
7 envolvidos em casos de fraude alimentar no mundo, encontraram o leite entre os
8 sete alimentos mais vulneráveis ao crime. O leite é um dos alimentos mais
9 adulterados, sendo este um dos principais problemas na indústria de laticínios
10 (Santos, Pereira-filho, & Colnago, 2016; Tsimidou et al., 2016).

11 Algumas substâncias possuem grandes chances de serem adicionadas
12 ao leite de forma fraudulenta sem serem detectadas, devido à sua semelhança com
13 os componentes da matéria-prima. São eles os produtos que contêm as substâncias
14 extraídas do próprio leite, como soro de queijo, que é misturado ao leite com o
15 propósito de aumentar o volume do produto (Liu et al., 2015).

16 A elevada frequência de leite fraudado com soro de queijo, pode ser
17 explicada pelo fato de o soro ser um subproduto de baixo custo, obtido durante a
18 produção de queijo e que, muitas vezes, não tem aproveitamento pelas indústrias
19 (Chávez & Jauregui, 2012; Nascimento et al., 2017). Apesar de não representar risco
20 iminente à saúde, essa fraude não deixa de ter implicações nutricionais, econômicas
21 e legais (Chávez & Jauregui., 2012). É uma fraude que traz séria preocupação para
22 a indústria idônea, uma vez que a fraude produz uma competitividade desleal. O
23 soro possui muitas propriedades naturais do leite, podendo muitas vezes estar
24 presente e não ser detectado (Das et al., 2015).

25 Observa-se um grande aumento no fenômeno das adulterações do
26 leite, sendo a contaminação mais frequente a adição de soro de leite, por ser um
27 produto 90% mais barato que o leite, além de ser de difícil detecção utilizando
28 apenas um teste (Karthek et al., 2011). Segundo Alves et al. (2018), seus estudos
29 demonstraram que é possível adicionar até 10% de qualquer tipo de soro de leite
30 sem que haja extrapolação para parâmetros específicos de normalidade do leite.

31 A grande maioria dos métodos utilizados para a detecção do soro de
32 queijo no leite se baseiam na busca do marcador caseinomacropéptido (CMP)
33 (Rocha et al., 2015). As abordagens para a identificação de soro baseadas em

1 componentes proteicos, utilizam principalmente métodos cromatográficos,
2 eletroforéticos e imunológicos (Camerini et al., 2016). O CMP, é um
3 glicomacropéptido (GMP) específico, liberado no soro durante o processo de
4 fabricação do queijo (Bremer et al., 2008; Cassoli, Sartori, & Machado, 2011; Motta
5 et al., 2014; Bilge et al., 2016; Abbas et al., 2018). No entanto, um produto
6 semelhante ao CMP, conhecido como pseudo-caseinomacropéptido (pseudo-
7 CMP), pode ser formado no leite líquido devido à ação de proteases produzidas por
8 microrganismos psicrotóxicos (Noni & Resmini, 2005).

9 A presença do pseudo-CMP pode ser um fator limitante aos testes que
10 detectam a ocorrência de fraude por adição de soro de queijo através do CMP
11 (Martín-Hernández et al., 2009), pois, a semelhança entre CMP e pseudo-CMP pode
12 interferir nos resultados, respondendo como falso-positivo. De acordo com o Manual
13 de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, o método oficial
14 para a detecção e quantificação de CMP emprega a cromatografia líquida de alta
15 eficiência (CLAE – do inglês HPLC), com separação em coluna de permeação em
16 gel ou de exclusão por tamanho e detecção em ultravioleta (UV) (Brasil, 2019).
17 Porém, muitos autores citaram a ineficiência na diferenciação do CMP e pseudo-
18 CMP através de análises por HPLC (Recio & Lo, 1996; Recio et al., 2000; Bremer et
19 al., 2008; Martín-Hernández et al., 2009; Neelima, Rajput & Mann., 2013; Motta et
20 al., 2014; Rocha et al., 2015).

21 Mara et al. (2015), relataram que alguns métodos para a detecção de
22 soro de queijo em leite demandam longo tempo e trabalho laboratorial especializado,
23 possuindo muitas vezes limites mínimos de detecção quantitativa muito altos. Por
24 isso, se faz fundamental o desenvolvimento de análises simples, rápidas e precisas
25 para a detecção do soro de queijo no leite (Vieira et al., 2015).

26 A autenticidade do leite deve ser constantemente investigada, sendo
27 de suma importância do ponto de vista econômico e de saúde pública (Karthek et
28 al., 2011). Diante de um cenário em que ocorrem diversas fraudes, se torna cada
29 vez mais importante a capacidade de detecção rápida e confiável de adulterações
30 em leite (Qin, Chao, & Kim, 2013; Jia et al., 2014; Zhang et al., 2014; Das et al.,
31 2015; Kamal & Karoui, 2015; Draher et al., 2016; Fanali, Dugo, & Mondello, 2016;
32 Yang et al., 2016;) Sendo assim, torna-se essencial obter ferramentas de triagem de
33 uso fácil e de baixo custo para avaliação rápida de rastreabilidade e controle de
34 fraudes (Nardiello et al., 2018).

1 Em se tratando de técnicas analíticas para fins de separação,
2 identificação e quantificação de componentes amostrais, o HPLC se destaca como
3 uma das melhores (Kamal & Karoui, 2015), sendo vastamente utilizado na detecção
4 de fraudes em alimentos (Tsimidou et al., 2016). A técnica de separação utilizada
5 pela cromatografia é muito importante e eficiente, podendo ser aplicada à alimentos
6 complexos (Zhang et al., 2011). O HPLC permite a medição simultânea de vários
7 compostos em uma única análise, sendo uma ótima ferramenta ao se tratar da
8 matéria-prima leite, pois consegue identificar e quantificar diversas moléculas, sendo
9 muito importante para a determinação de sua autenticidade (Kamal & Karoui, 2015).

10 Diante da dificuldade em se diferenciar o CMP do pseudo-CMP, é
11 necessária a busca de outros marcadores que possam identificar a presença de soro
12 no leite. O ácido benzoico, o ácido sórbico e seus sais são exemplos de
13 conservantes vastamente utilizados em diversos alimentos. No entanto, o uso de
14 conservantes em leite não é permitido no Brasil (Brasil, 2018). Entretanto, esses sais
15 são utilizados na conservação dos coagulantes comerciais, que são empregados na
16 produção do queijo. Assim, os resíduos dos conservantes permanecem no soro de
17 queijo e seu uso como marcadores pode representar uma alternativa confiável para
18 identificação deste tipo de fraude. Sendo assim, o presente estudo teve como
19 objetivo a aplicação de um novo método, para a detecção por cromatografia líquida
20 de alta eficiência com arranjo de diodos no UV (HPLC-PDA) dos conservantes
21 benzoato de sódio e sorbato de potássio, como indicadores de fraude por adição de
22 soro de queijo ao leite.

23 **2 Material e métodos**

24 **2.1 Material**

25 Os padrões de benzoato de sódio e sorbato de potássio foram
26 provenientes da Dinâmica (São Paulo – Brasil). A água ultrapura foi obtida através
27 de um sistema Milli-Q® (Millipore, Billerica, MA, EUA). A acetonitrila (ACN) grau
28 HPLC foi obtida da J.T. Baker (Avantor, México). Os coagulantes foram obtidos de
29 indústrias lácteas, indústrias produtoras de coagulantes e do mercado.

1 2.2 Obtenção do soro de queijo

2 Foram utilizados 11 coagulantes de diferentes marcas e
 3 concentrações, incluindo o ácido cítrico, para o preparo do queijo em laboratório, de
 4 acordo com instruções do fabricante, sendo que seis dos coagulantes apresentaram
 5 o conservante benzoato de sódio, três apresentaram os conservantes benzoato de
 6 sódio e sorbato de potássio e apenas um coagulante não apresentou nenhum dos
 7 conservantes. O leite foi pasteurizado de forma lenta (63 a 65°C por 30 minutos),
 8 resfriado até 37°C para adição de fermento láctico, e em seguida adicionou-se o
 9 cloreto de cálcio e por fim o coagulante desejado (Quadro 1), aguardou-se o tempo
 10 de coagulação (aproximadamente 60 minutos), realizou-se o corte da massa e a
 11 mexedura. O soro obtido foi reservado em frascos esterilizados e congelados para
 12 as futuras análises.

13 **Quadro 1.** Volume de coagulante, de acordo com instruções do fabricante, utilizado
 14 na produção experimental do queijo para a obtenção do soro

Amostra do coagulante	Poder de coagulação (coagulante:leite)	Volume coagulante (mL)/ 1 L de leite
1	1:3000	0,90
2	1:50000	0,06
3	1:50000	0,06
4	1:50000	0,07
5	1:50000	0,07
6	1:100000	0,04
7	1:50000	0,07
8	1:3000	1,00
9	1:40000	0,30
10	1:50000	0,07
11	-	60,00*

15 *ácido cítrico

16 2.3 Preparo de amostras de soro e leite adulterado com soro

17 Foram estudadas 11 amostras de soro de queijo produzidos no
 18 laboratório com a utilização de leite cru, proveniente da Fazenda Escola da
 19 Universidade Estadual de Londrina. Utilizou-se 10 coagulantes comerciais distintos
 20 (todos com enzima quimosina – amostras 1 a 10), e em um queijo utilizou-se apenas
 21 o ácido cítrico (amostra 11). Outras 19 amostras de soro de queijo foram coletadas
 22 de queijarias comerciais e artesanais da região de Londrina (amostras 12 a 30).

1 Utilizou-se também amostras de leite cru experimentalmente
2 adulteradas com os 30 diferentes soros obtidos anteriormente, nas proporções, 1%,
3 5%, 10%, 20% e 50%, totalizando 150 amostras de leite experimentalmente
4 adulteradas.

5 **2.4 Extração de amostras**

6 Para a fase de extração utilizou-se a diluição da amostra a ser
7 analisada com acetonitrila (J.T. Baker[®], Avantor, México) 1:1 (v/v), seguida por
8 homogeneização em vórtex por um minuto e centrifugação à 10.000 rpm (Força G:
9 480) em centrífuga de microtubos (Fisher Scientific) por 10 minutos. Posteriormente,
10 o sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE) 0,22
11 µm (Millipore[®] – Millex, Billerica, MA, EUA) e depositado em frasco âmbar (*vials*) de
12 2,0 mL (Agilent, Walsdorf, Alemanha). Para a utilização da amostra em dias
13 distintos, a mesma foi acondicionada em refrigerador a aproximadamente 4°C.

14 **2.5 Equipamento e condições cromatográficas**

15 A determinação e a quantificação dos conservantes extraídos foram
16 realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Shimadzu, Quioto,
17 Japão), composto por bomba LC-20AT, com sistema gerenciador de gradiente e
18 degaseificador DGU-20A com injetor automático SIL-20AC com amostrador de 70
19 *vials*. A coluna utilizada foi uma coluna C18 – Luna (250 mm × 4,6 mm, 5,0 µm,
20 Phenomenex, Califórnia, EUA), mantida a 40 °C em um forno CTO-20A e a detecção
21 foi feita pelo detector de arranjo de diodos (PDA), gerenciados pela controlada CBM-
22 20A, comandados pelo software LC-Solution (Versão 1.21). Utilizou-se como fase
23 móvel acetonitrila e tampão fosfato 12:88 (v/v) com pH 4,0, em uma vazão de 1,0 mL
24 min⁻¹ e o tempo de corrida utilizado foi de 25 min por amostra. O volume de injeção
25 de cada amostra foi de 10,0 µL. Os comprimentos de onda máximos selecionados
26 para a determinação de benzoato de sódio e sorbato de potássio foram 225 e 255
27 nm, respectivamente (Gören et al., 2015).

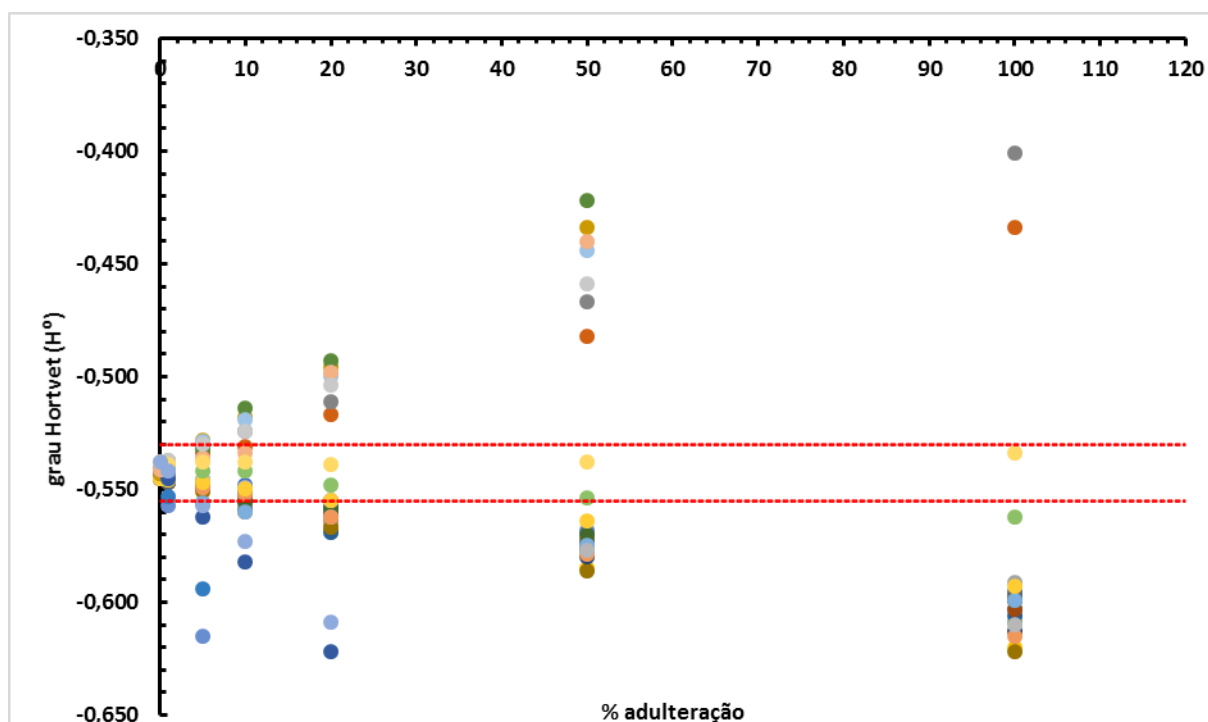
28 **2.6 Análise de crioscopia e pH**

1 Para análises do índice crioscópico foi utilizado um crioscópio digital
 2 micro processado PZL 7000 – PZL, sendo utilizados 2,5mL da amostra em tubo
 3 próprio, em triplicata, para a leitura do ponto de congelamento no equipamento. Para
 4 análises de pH foi utilizado um pHmetro digital HI 8424 – Hanna.

5 3 Resultados e discussão

6 Os pontos de congelamento para as 30 amostras contendo soro de
 7 queijo no leite analisados pelo crioscópio estão apresentados na Tabela 1 do
 8 Apêndice A e variaram de $-0,401^{\circ}\text{H}$ a $-0,696^{\circ}\text{H}$. Os resultados dos índices
 9 crioscópicos estão ilustrados na Figura 1, sendo cada amostra de soro com as
 10 variações na proporção de adulteração representadas por uma cor distinta no
 11 gráfico.

12 **Figura 1.** Gráfico dos índices crioscópicos ($^{\circ}\text{H}$) de 30 amostras analisadas de soro
 13 de queijo e de leite adulteradas com soro nas proporções 50%, 20%, 10%, 5% e 1%
 14

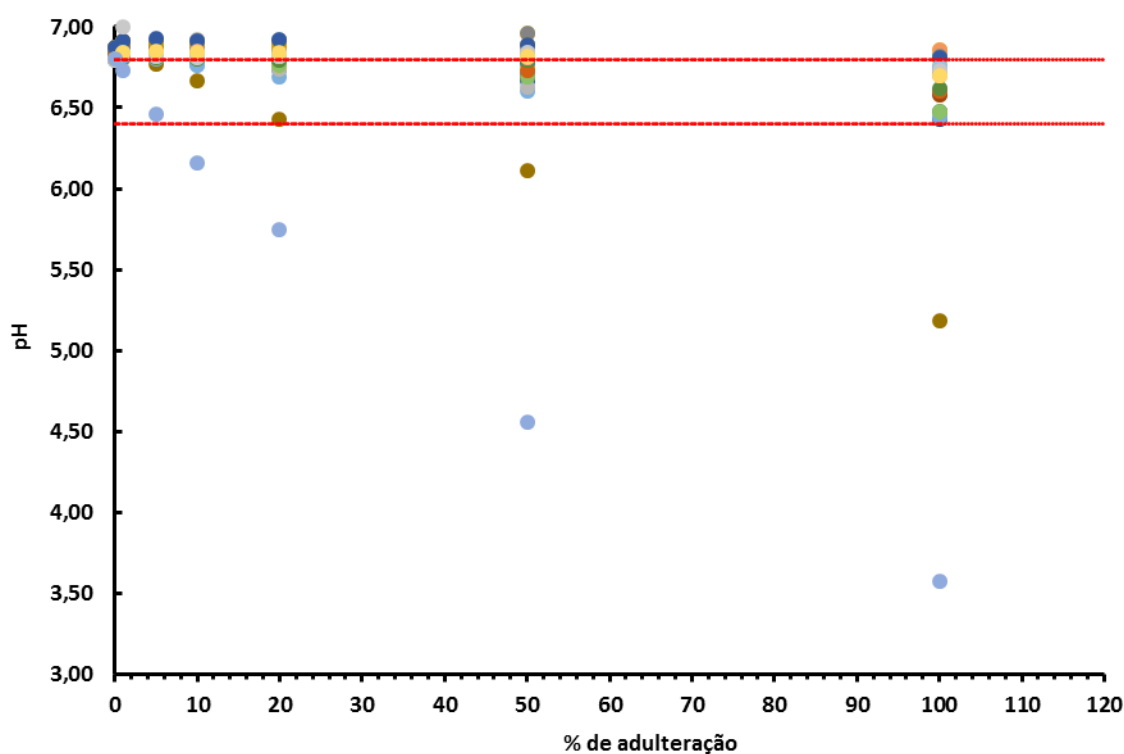


15
 16 Os valores deste estudo foram mais negativos do que o $-0,665^{\circ}\text{H}$
 17 encontrado por Teixeira e Fonseca (2008). A crioscopia do leite, é mais elevada e,
 18 legalmente, tem que estar entre $-0,530^{\circ}\text{H}$ e $-0,555^{\circ}\text{H}$ (Brasil, 2018), conforme
 19 delimitado pelas linhas vermelhas (Figura 1). Porém, mesmo com valores
 20 frequentemente mais aprofundados para o soro, os resultados obtidos neste estudo

1 mostram que este parâmetro não pode ser utilizado de forma confiável para a
2 detecção desta fraude na rotina, uma vez que, dependendo do valor do índice
3 crioscópico inicial, que pode sofrer interferência de alguns fatores, como o método
4 de preparo do queijo e a quantidade de sal, e da quantidade de soro utilizada, a
5 crioscopia do leite, na maioria dos casos, tende a ficar no intervalo especificado de
6 normalidade para o leite. Nossos resultados mostraram que o valor da crioscopia de
7 um leite adulterado com 10% de soro de queijo obteve um valor médio de $-0,546^{\circ}\text{H}$,
8 estando, a maioria das amostras de acordo com valores de normalidade
9 determinados pela legislação para leite.

10 O pH das amostras foi outro parâmetro básico avaliado, já que foi
11 aprovado recentemente um regulamento técnico que fixa os padrões de identidade e
12 qualidade para o soro. Neste regulamento os valores de normalidade de pH do soro
13 de queijo variam entre 6,0 a 6,8 (Brasil, 2021), enquanto para o leite a faixa de
14 variação é de 6,4 a 6,8 (Beloti, 2015). Os resultados de pH apresentados na Tabela
15 2 – Apêndice B para este estudo, mostram um valor médio de pH de 6,53 foi obtido
16 para o soro de queijo. Nota-se ainda pelo gráfico da Figura 2 que o leite adulterado
17 com 10% de soro de queijo apresentou média de pH de 6,80.

18 **Figura 2.** Resultados do pH para as 30 amostras analisadas de soro de queijo e de
19 leite adulteradas com soro nas proporções de 50%, 20%, 10%, 5% e 1%, com
20 destaque para o intervalo de especificação de pH para o leite com os valores
21 mínimos e máximos delimitado pelas linhas vermelhas (6,4-6,8)



1

2

O fato de as características físico-químicas do soro de queijo e do leite serem muito parecidas, torna a detecção desta adulteração muito complexa, sendo fundamental o desenvolvimento de análises simples, rápidas e precisas para a detecção do soro de queijo no leite (Vieira et al., 2015). Por isso, não é recomendado o uso de análises de rotina na detecção de fraudes, embora as alterações nessas análises possam indicar adulterações, devendo ocorrer uma investigação nesses casos.

9

10

O método avaliado neste estudo para a detecção de soro de queijo em leite faz uso de HPLC-PDA, em que a finalidade é a detecção dos resíduos dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio, utilizados para conservar o coalho. A técnica foi aplicada com sucesso para análises de amostras de leite adulteradas com soro de queijo, já que os coagulantes, que são utilizados na fabricação do queijo, contêm o conservante benzoato de sódio, sorbato de potássio ou ambos. Parte do resíduo do conservante permanece no soro de queijo após a formação da massa, podendo ser utilizado como um marcador para detecção desta fraude.

18

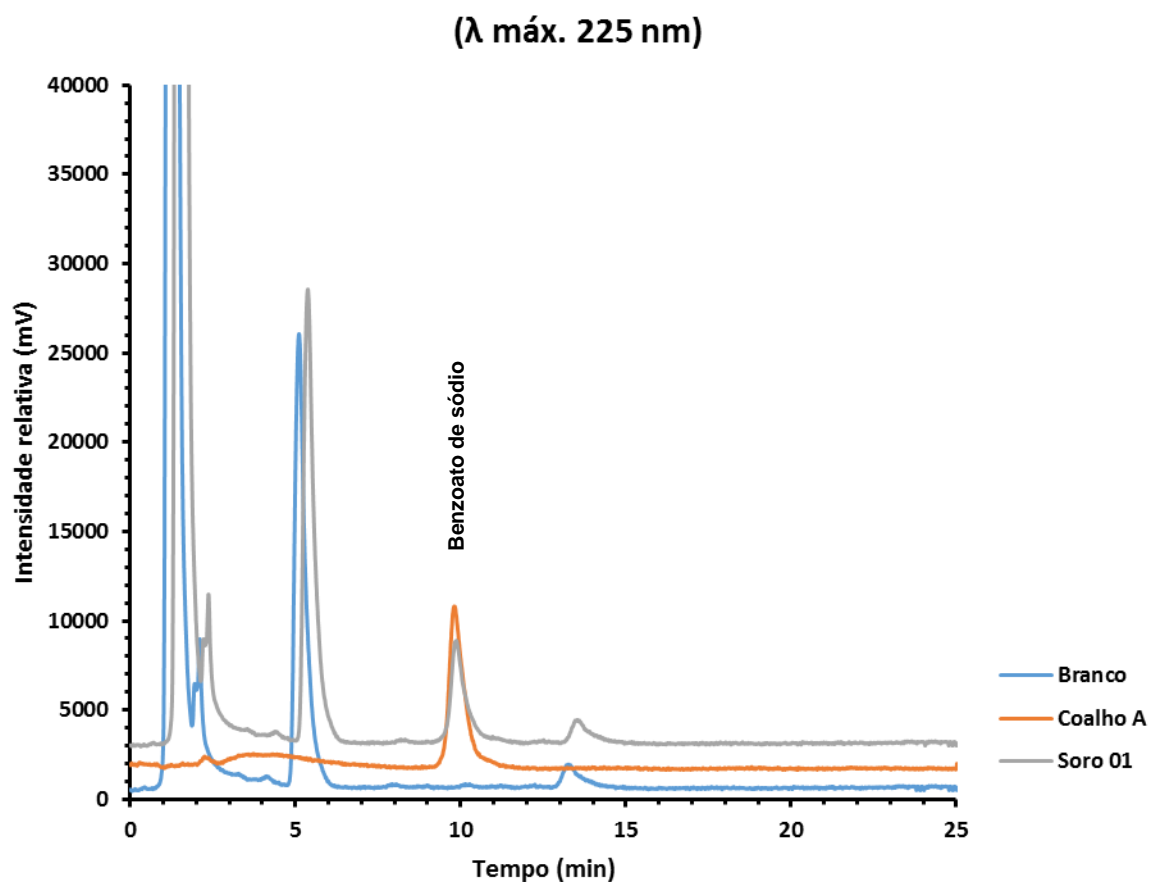
19

20

Na Figura 3 estão apresentados os cromatogramas de amostras de leite cru (branco), do coagulante utilizado na produção do queijo (coalho A) e do soro (Soro-01) obtido após a fabricação com o coalho contendo benzoato.

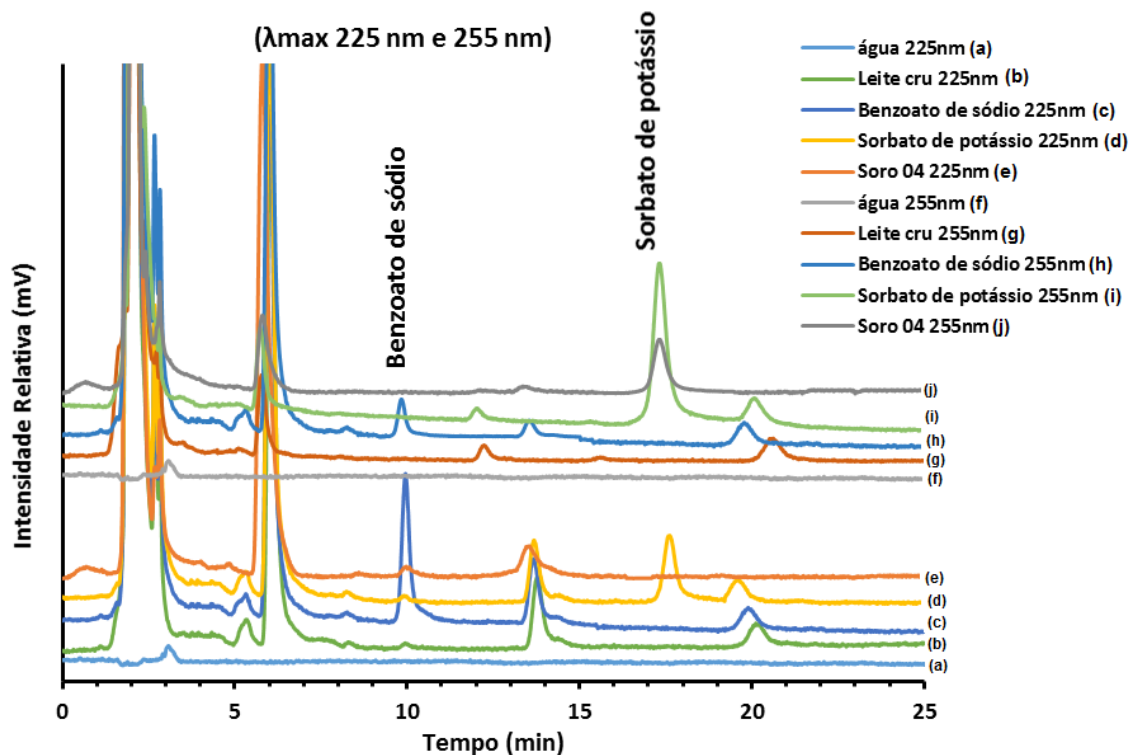
- 1 Observa-se na Figura 1 a presença do conservante benzoato de
- 2 sódio por meio do aparecimento dos picos no tempo de retenção de 9,81 minutos
- 3 apenas no coalho e no soro de queijo, não havendo sinal de pico deste conservante
- 4 no leite cru.
- 5

- 1 **Figura 3.** Cromatogramas das análises por HPLC-PDA de amostras de leite cru, do
2 coagulante utilizado na produção do queijo e do soro do queijo fabricado com o uso
3 deste mesmo coagulante



- 4
5 Na Figura 4 estão apresentados os cromatogramas dos padrões dos
6 conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio, de amostras de água, de
7 leite cru não adulterado e do soro de queijo que continha os 2 conservantes nos
8 comprimentos de onda máximos de 225 e 255 nm.
9

1 **Figura 4.** Cromatogramas de análises por HPLC-PDA nos comprimentos de onda de
 2 225 nm e 255 nm de amostras de água, leite cru, padrões diluídos em leite contendo
 3 os dois conservantes - benzoato de sódio e sorbato de potássio (5 mg L⁻¹) e do soro
 4 de queijo



5
 6 Observa-se nos cromatogramas da Figura 5, que para as amostras de
 7 água e de leite cru há ausência de sinal analíticos nos tempos de retenção dos
 8 padrões de benzoato de sódio (9,81) e sorbato de potássio (17,37), enquanto
 9 aparecem os picos destes analitos nas amostras de soros que continham esses
 10 conservantes.

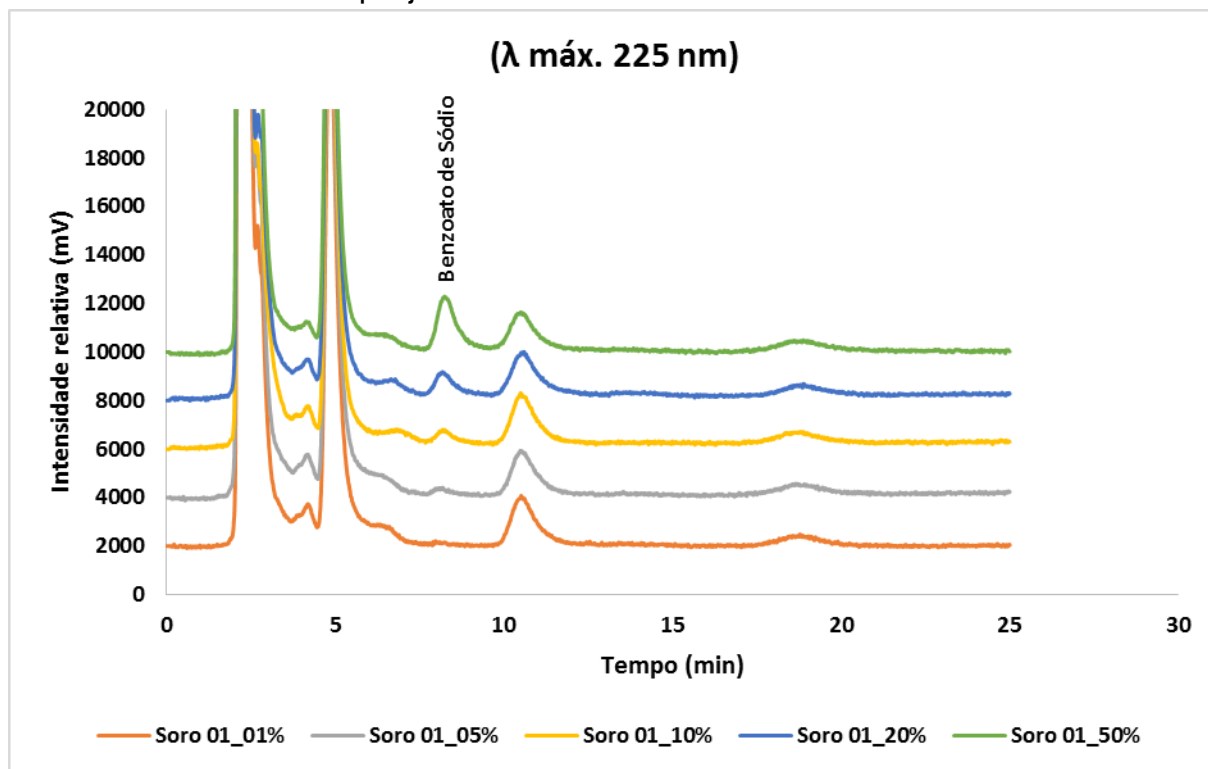
11 A aplicação do método proposto se mostrou prática, com curto tempo
 12 de execução e adequada para a investigação desta adulteração na rotina dos
 13 laboratórios de controle de qualidade, já que praticamente a totalidade dos soros de
 14 queijo apresentaram o conservante benzoato de sódio.

15 Os cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de leite
 16 experimentalmente fraudadas com soro de queijo nas proporções de 1%, 5%, 10%,
 17 20% e 50%, usando o método HPLC – PDA desenvolvido e validado, estão
 18 apresentados na Figura 5, indicam que o benzoato de sódio foi encontrado na
 19 amostra de forma proporcional à porcentagem utilizada na adulteração.

20

21

- 1 **Figura 5.** Cromatograma de amostras de leite cru contendo diferentes porcentagens
2 adicionadas de soro de queijo



3

4

5

Os resultados de quantificação do benzoato de sódio nas amostras
6 de soro e nas amostras de leite experimentalmente fraudadas analisadas pelo
7 método de HPLC-PDA proposto estão apresentados no Apêndice A - Tabela 3,
8 sendo ilustrados na Figura 6, estando os limites de detecção ($0,204 \text{ mg L}^{-1}$) e de
9 quantificação ($0,618 \text{ mg L}^{-1}$) delimitados pelas linhas vermelhas pontilhadas.

10

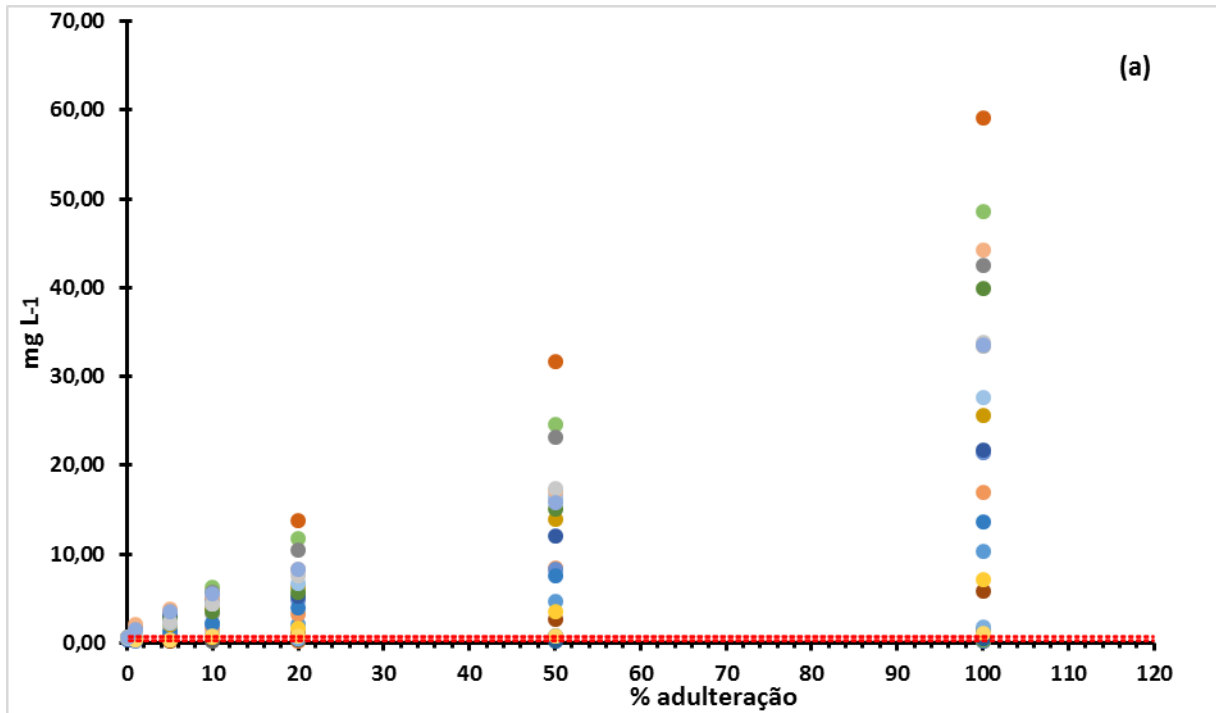
O perfil cromatográfico de algumas amostras de soro de queijo
11 selecionadas está apresentado na Figura 7, juntamente com uma amostra de leite
12 cru não adulterado e amostras contendo os padrões, nos comprimentos de onda de
13 225 nm (a) e 255 nm (b).

14

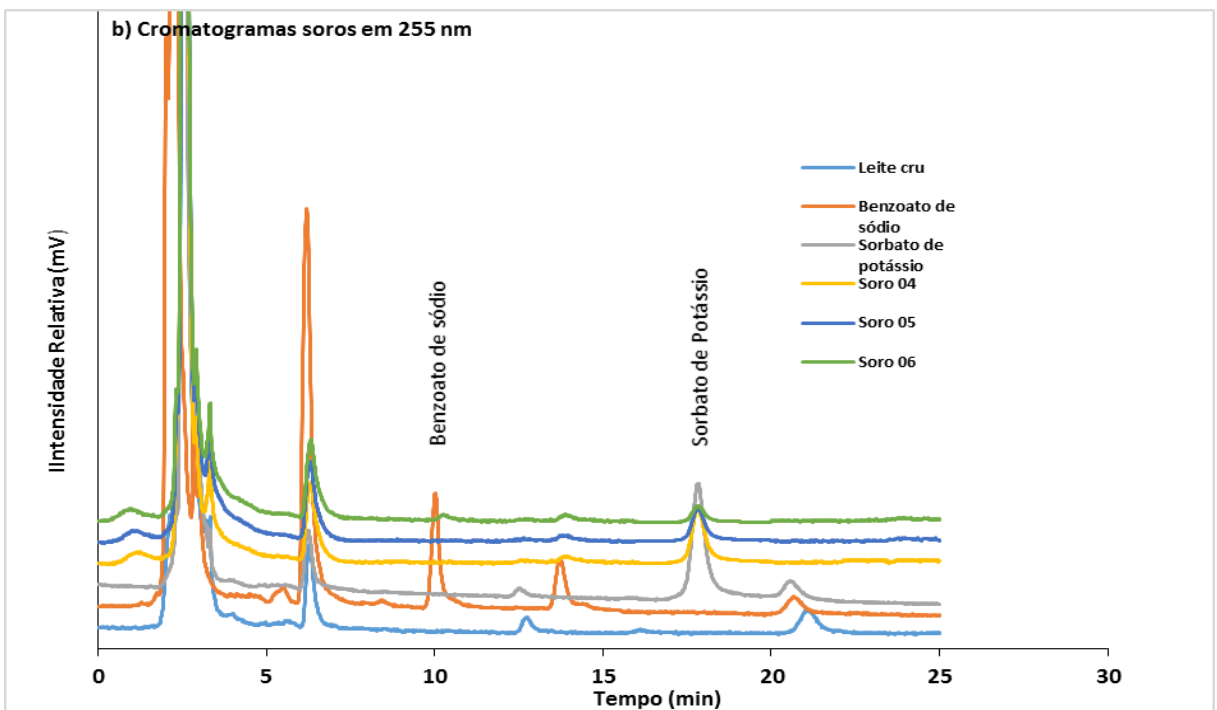
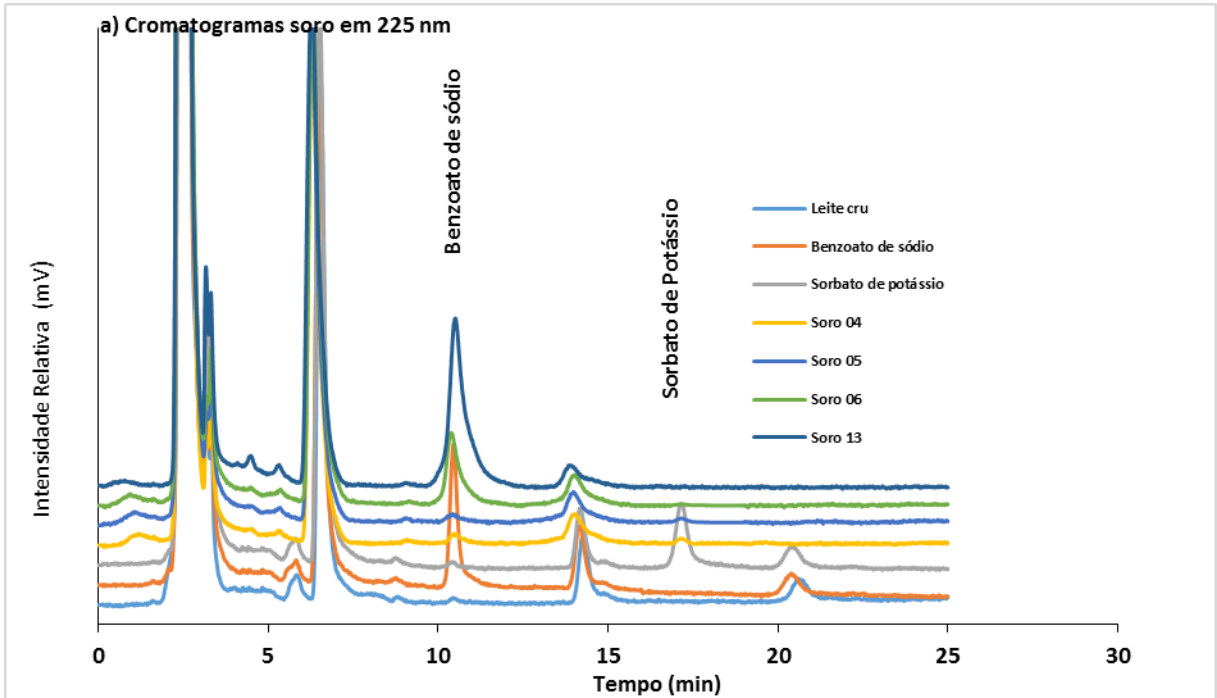
Apenas três amostras de soro de queijo apresentaram o conservante
15 sorbato de potássio junto ao benzoato de sódio, estando suas quantificações
16 apresentadas na Tabela 2.

17

- 1 **Figura 6.** Quantificação de benzoato de sódio nas 30 amostras de soro de queijo e
2 amostras de leite experimentalmente fraudadas, com os respectivos soros, nas
3 proporções de 100% soro, 50% soro, 20% soro, 10% soro, 5% soro e 1% soro. **(a)**
4 Quantificação até 70,00 mg L⁻¹. **(b)** Quantificação até 10,00 mg L⁻¹
5



- 1 **Figura 7.** Cromatograma dos perfis dos soros de queijo de amostras analisadas,
2 juntamente de amostras de leite cru, amostra de leite experimentalmente adulterada
3 com benzoato de sódio e amostra de leite experimentalmente adulterada com
4 sorbato de potássio em (a) 225nm e (b) 255 nm



- 7

1 **Tabela 1.** Quantificação do sorbato de potássio pelo método proposto de HPLC-PDA
 2 em três amostras de soro de queijo que apresentaram este conservante

Amostra	100% soro	50% soro	20% soro	10% soro	5% soro	1% soro
	[sorbato de potássio] (mg L ⁻¹)					
4	0,65 ± 0,02	0,33 ± 0,00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	0,66 ± 0,00	0,31 ± 0,00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	0,40 ± 0,00	0,20 ± 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

3 N.D.: Não detectável

4

5 Os resultados obtidos com a quantificação dos conservantes nas
 6 amostras de soro analisadas pelo método proposto de HPLC-PDA, demonstraram
 7 que 27 (93,10%) apresentaram o conservante benzoato de sódio, e 3 dessas,
 8 também apresentaram o conservante sorbato de potássio. Das 3 amostras (10%)
 9 que não apresentaram nenhum dos dois conservantes, uma delas era proveniente
 10 de coagulação ácida por ácido cítrico e duas delas provenientes de um mesmo
 11 coagulante, sendo o único que não apresentou a presença de nenhum dos
 12 conservantes descritos na embalagem.

13 Em algumas amostras em que a quantidade de conservante residual
 14 no soro foi baixa, sua quantificação pôde ser feita no soro puro e 50% do soro
 15 diluído em leite. Isso pode ter ocorrido pelo fato dos coagulantes utilizados para a
 16 obtenção dos soros em questão possuírem alto poder coagulante, sendo seu uso
 17 indicado em pequenas quantidades para a coagulação perfeita da massa, fazendo
 18 com que o volume do conservante residual no soro seja menor. Já quando a
 19 quantidade do coagulante a ser utilizado é regular, como observamos na grande
 20 maioria das amostras coletadas de queijarias, podemos observar um consequente
 21 aumento na quantidade de conservantes no soro, sendo o método capaz de detectar
 22 até 5% de soro de queijo adicionado ao leite.

23 Como o conservante sorbato de potássio foi detectado em apenas três
 24 amostras de soro de queijo (10%) e em baixas quantidades, amostras estas que
 25 também continham o conservante benzoato de sódio, não serviria como um
 26 marcador de primeira escolha na pesquisa de casos de fraudes por adição de soro,
 27 visto que a maior parte dos coagulantes não o apresentaram em sua composição.
 28 Contudo, sua identificação em amostras de leite é forte indicativo da presença de
 29 adulterações por adição de soro de queijo em leite.

30 Zhang et al. (2014), Yang et al. (2016), Forchetti & Poppi (2017) e
 31 Karunathilaka et al., (2018), em suas pesquisas por adulterantes, utilizaram NIR,

1 sendo que o primeiro constatou que o equipamento distingue bem o leite adulterado
2 por soro de queijo com porcentagens iguais ou maiores que 5% de adulteração.
3 Sendo o resultado semelhante ao encontrado neste trabalho, em que se detecta
4 adulterações de 5% com eficiência.

5 Santos, Pereira-filho, & Rodriguez-saona (2015) utilizaram o MIR em
6 pesquisas para detecção de soro de queijo presente no leite, sendo um equipamento
7 de uso simples e não destrutivo, obtendo valores de detecção de soro de queijo
8 maiores que 7,5 g L⁻¹. Já outros autores optaram pelo uso do FTIR na pesquisa por
9 soro de queijo em leite (Barbosa et al., 2017; Cassoli, Sartori & Machado, 2011; Liu
10 et al., 2015; Mara et al., 2015; Vieira et al., 2015). Cassoli, Sartori & Machado (2011)
11 observaram resultados de baixa sensibilidade utilizando o método FTIR, mesmo em
12 amostras com altas concentrações de fraude. Já Liu et al. (2015) detectaram fraudes
13 de soro de queijo em leite acima de 5% e Vieira et al. (2015) utilizaram valores de 6
14 a 28% desta fraude na validação de sua pesquisa, ambos utilizaram FTIR.

15 A utilização de biomarcadores para a detecção de adulterações no leite
16 também pode ser uma alternativa. Tripathy et al. (2017) em sua pesquisa,
17 analisando diversos adulterantes em leite, incluindo o benzoato de sódio,
18 combinaram dois marcadores para a obtenção de melhores resultados, o pH e a
19 condutividade elétrica, demonstrado que o desempenho é melhor do que com a
20 utilização de apenas um marcador individual, obtendo o limite de detecção de 0,10
21 mg mL⁻¹. Abbas et al. (2018), utilizaram em sua pesquisa, para a detecção de fraude
22 por adição de soro, o CMP como um biomarcador, mostrando precisão satisfatória e
23 limite de detecção de 1,0 µg mL⁻¹. Apesar da sensibilidade do método proposto pelo
24 autor ser alta devemos considerar que através da pesquisa por CMP podemos obter
25 resultados falso positivos.

26 Diversos equipamentos e métodos são utilizados para a pesquisa de
27 soro de queijo em leite, mas a maioria utiliza a espectrometria de massas na
28 detecção de CMP (Jia et al., 2014; Lenardon et al., 2017; Makhoul et al., 2016; Motta
29 et al., 2014).

30 A espectrometria de massas (MS) é habitualmente utilizada devido à
31 sua capacidade de distinção de pequenas diferenças na comparação de matrizes
32 com alta complexidade (Medina et al., 2019). Abordagens mais sofisticadas, como a
33 utilização de espectrometria de massas acoplada a diversos detectores são grandes
34 aliadas na detecção de diversas fraudes, porém exigem instalações onerosas e

1 modernas além de mão de obra qualificada (Bremer et al., 2008; Stadler et al.,
2 2016), não sendo, em algumas vezes, viável aos laboratórios em análises de rotina,
3 havendo a necessidade da descoberta de alternativas menos onerosas, além da alta
4 demanda analítica que requer procedimentos mais rápidos e simplificados.

5 Embora a detecção de CMP ainda seja um dos métodos analíticos
6 mais utilizados na detecção do soro de queijo em leite (Vieira et al., 2015), uma
7 porcentagem de amostras pode apresentar resultados falso-positivos, devido à
8 presença do pseudo-CMP (Bremer et al., 2008). Por isso, justifica-se a busca por
9 métodos alternativos para a detecção de substâncias estranhas ao leite, como o
10 soro de queijo, como foi realizado neste trabalho. A utilização de novas
11 metodologias com o auxílio ou não de equipamentos, bem como o aperfeiçoamento
12 de técnicas já existentes, é de suma importância no controle de qualidade de
13 alimentos como o leite.

14 As técnicas cromatográficas são muito utilizadas na caracterização e
15 autenticação de alimentos, visto que proporcionam alta sensibilidade,
16 reprodutibilidade e robustez, permitindo obter sinais analíticos com alto conteúdo de
17 informação (Esteki et al., 2018), medindo simultaneamente vários compostos em
18 uma única análise. Por meio da cromatografia líquida pôde-se desenvolver um novo
19 método capaz de detectar a adulteração por adição de soro de queijo em leite
20 através da quantificação de conservantes, principalmente o benzoato de sódio,
21 provindos dos coagulantes utilizados no preparo da massa de queijo e presentes
22 nas amostras de soro, sendo as únicas substâncias até então detectadas que se
23 fazem presentes no soro de queijo e não estão presentes no leite, evitando desta
24 forma resultados falso-positivos na detecção desta fraude.

25 **4 Conclusão**

26 A utilização do método empregando HPLC-PDA desenvolvido e
27 validado para a identificação dos conservantes benzoato de sódio e sorbato de
28 potássio em uma abordagem inédita para a detecção da presença de fraude por
29 adição de soro de queijo em leite, traz uma alternativa viável para análises de
30 pesquisa desta adulteração, não tendo sido até o momento relatados testes da
31 mesma natureza, visto que os testes para a detecção do soro em sua maioria

1 abordam a presença do CMP. A metodologia previamente validada demonstrou
2 eficácia, já que a proporção de soro utilizada em adulterações desta natureza,
3 geralmente é maior do que 10%, sendo facilmente detectadas pelo método proposto,
4 podendo ser indicado o seu uso como alternativa ou de forma simultânea aos
5 métodos tradicionais.

6

1 REFERÊNCIAS

- 2 Abbas, O., Zadavec, M., Baeten, V., Miku, T., Le, T., & Vuli, A. (2018). Analytical
3 methods used for the authentication of food of animal origin, 246(October 2017),
4 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.007>
- 5 Alves, É. D. P., Amico, L. D., José, A., Guimarães, K., Walter, H., Garcia, B., &
6 Fagnani, R. (2018). Milk adulteration with acidified rennet whey : a limitation for
7 caseinomacropptide detection by high-performance liquid chromatography,
8 (August 2017). <https://doi.org/10.1002/jsfa.8846>
- 9 Barbosa, T., Laerte, C., Cassoli, D., Henrique, P., Cerqueira, R., Krystine, H., ...
10 Machado, F. (2017). Adulteration identification in raw milk using Fourier
11 transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*.
12 <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2680-y>
- 13 Beloti, Vanerli. Leite: Obtenção, inspeção e qualidade. Edit. Planta, Londrina, 2015.
- 14 Bilge, G., Sezer, B., Efe, K., Berberoglu, H., Topcu, A., & Hakki, I. (2016).
15 Determination of whey adulteration in milk powder by using laser induced
16 breakdown spectroscopy. *Food Chemistry*, 212, 183–188.
17 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.169>
- 18 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº
19 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a
20 identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru
21 refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da
22 União, Brasília, 2018.
- 23 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos
24 oficiais para análise de alimentos de origem animal. Ministério da Agricultura,
25 Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. 2. ed. – Brasília
26 : MAPA, 2019.
- 27 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 386, de 25 de
28 agosto de 2021. Altera o anexo do Regulamentos Técnico que fixa de
29 Identidade e Qualidade para o soro de leite. Diário Oficial da União, Brasília,
30 2021.
- 31 Bremer, M. G. E. G., Kemmers-voncken, A. E. M., Boers, E. A. M., Frankhuizen, R.,
32 & Haasnoot, W. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection
33 of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder, 18, 294–

- 1 302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.08.008>
- 2 Camerini, S., Montepeloso, E., Casella, M., Crescenzi, M., Maria, R., & Fuselli, F.
3 (2016). Mass spectrometry detection of fraudulent use of cow whey in water
4 buffalo , sheep , or goat Italian ricotta cheese, *197*, 1240–1248.
5 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.073>
- 6 Cassoli, L. D., Sartori, B., & Machado, P. F. (2011). *Revista Brasileira de Zootecnia*
7 The use of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to determine adulterants
8 in raw milk, 2591–2596.
- 9 Chávez, N. A., & Jauregui, J. (2012). A highly sensitive sandwich ELISA for the
10 determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk, 121–132.
11 <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0052-3>
- 12 Das, S., Sivaramakrishna, M., Biswas, K., & Goswami, B. (2015). A low cost
13 instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. *ISA*
14 *Transactions*, *56*, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.isatra.2014.11.021>
- 15 Draher, J., Ehling, S., Cellar, N., Reddy, T., Henion, J., & Sousou, N. (2016).
16 Determination of emerging nitrogenous economic adulterants in milk proteins by
17 high-performance liquid chromatography / compact mass spectrometry,
18 (January), 1265–1272. <https://doi.org/10.1002/rcm.7568>
- 19 Esteki, M., Simal-gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., & Dashtaki, E. (2018). A
20 review on the application of chromatographic methods , coupled to
21 chemometrics , for food authentication. *Food Control*, *93*(June), 165–182.
22 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.06.015>
- 23 Fanali, C., Dugo, L., & Mondello, L. (2016). *10 - Advances in Chromatographic*
24 *Techniques for Food Authenticity Testing. Advances in Food Authenticity*
25 *Testing*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00010-2>
- 26 Forchetti, A. P., & Poppi, R. J. (2017). *LWT - Food Science and Technology* Use of
27 NIR hyperspectral imaging and multivariate curve resolution (MCR) for
28 detection and quanti fi cation of adulterants in milk powder. *LWT - Food Science*
29 *and Technology*, *76*, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.046>
- 30 Gören, A. C., Bilsel, G., Simsek, A., Bilsel, M., Akçadag, F., Topal, K., Ozgen, H.
31 (2015). HPLC and LC – MS / MS methods for determination of sodium benzoate
32 and potassium sorbate in food and beverages : Performances of local accredited
33 laboratories via proficiency tests in Turkey, *175*, 273–279.
34 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.094>

- 1 Jia, W., Ling, Y., Lin, Y., Chang, J., & Chu, X. (2014). Analysis of additives in dairy
2 products by liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap mass
3 spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1336, 67–75.
4 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.028>
- 5 Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Trends in Food Science & Technology Analytical
6 methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and
7 detecting the adulteration of dairy products : A review. *Trends in Food Science &*
8 *Technology*, 46(1), 27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- 9 Kartheek, M., Smith, A. A., Muthu, A. K., & Manavalan, R. (2011). Determination of
10 Adulterants in Food : A Review, 3(2), 629–636.
- 11 Karunathilaka, S. R., Jean, B., He, K., & Kyu, J. (2018). Non-targeted NIR
12 spectroscopy and SIMCA classification for commercial milk powder
13 authentication : A study using eleven potential adulterants. *Heliyon*, (September),
14 e00806. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00806>
- 15 Lenardon, L., Meneghini, L. Z., Hoff, R. B., Magalhães, T., Motta, C., Pizzolato, T. M.,
16 ... Bergold, A. M. (2017). Determination of Caseinomacropeptide in Brazilian
17 Bovine Milk by High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
18 Determination of Caseinomacropeptide in Brazilian Bovine Milk by High-
19 performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, 2719(June).
20 <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1263644>
- 21 Liu, J., Ren, J., Liu, Z., & Guo, B. (2015). Short communication A new
22 comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food*
23 *Chemistry*, 172, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063>
- 24 Makhoul, S., Yener, S., Khomenko, I., Capozzi, V., Cappellin, L., Aprea, E., &
25 Scampicchio, M. (2016). Rapid non-invasive quality control of semi- finished
26 products for the food industry by direct injection mass spectrometry headspace
27 analysis: the case of milk powder , whey powder and anhydrous milk fat,
28 (January), 782–791. <https://doi.org/10.1002/jms.3801>
- 29 Mara, B., Carvalho, A. De, Millena, L., Carvalho, D., Sélia, J., Antônio, L., ...
30 Carvalho, P. De. (2015). Rapid detection of whey in milk powder samples by
31 spectrophotometric and multivariate calibration. *FOOD CHEMISTRY*, 174, 1–7.
32 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.003>
- 33 Martín-Hernández, C., Muñoz, M., Daury, C., Weymuth, H., Kemmers-voncken, A. E.
34 M., Corbato, V., Toribio, T., Bremer, M. G. E. G. (2009).

- 1 Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added
2 bovine rennet whey in milk and milk powder, 19, 205–208.
3 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.016>
- 4 Medina, S., Pereira, J. A., Silva, P., Perestrelo, R., & Câmara, J. S. (2019). Food
5 fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety. *Food*
6 *Chemistry*, 278(November 2018), 144–162.
7 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.046>
- 8 Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and Application of a
9 Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration
10 from 1980 to 2010, 77(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x>
- 11 Motta, T. M. C., Hoff, R. B., Barreto, F., Andrade, R. B. S., Lorenzini, D. M.,
12 Meneghini, L. Z., & Pizzolato, T. M. (2014). Talanta Detection and con fi rmation
13 of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation
14 and liquid chromatography – electrospray – tandem mass spectrometry analysis.
15 *Talanta*, 120, 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.093>
- 16 Nardiello, D., Natale, A., Palermo, C., Quinto, M., & Centonze, D. (2018). Milk
17 authenticity by ion-trap proteomics following multi-enzyme digestion. *Food*
18 *Chemistry*, 244(October 2017), 317–323.
19 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.052>
- 20 Nascimento, C. F., Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Rocha, F. R. P. (2017).
21 Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry*, 221,
22 1232–1244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034>
- 23 Neelima, S. R., Rajput, Y. S., Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of
24 glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey
25 adulteration in milk : a review, 21–43. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0095-0>
- 26 Noni, I. De, & Resmini, P. (2005). Food Chemistry Identification of rennet-whey solids
27 in “ traditional butter ” by means of HPLC / ESI-MS of non-glycosylated
28 caseinomacropeptide A, 93, 65–72.
29 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.011>
- 30 Qin, J., Chao, K., & Kim, M. S. (2013). Simultaneous detection of multiple adulterants
31 in dry milk using macro-scale Raman chemical imaging. *Food Chemistry*, 138(2–
32 3), 998–1007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.115>
- 33 Recio, I., & Lo, R. (1996). Study of the Formation of Caseinomacropeptides in Stored
34 Ultra-High-Temperature-Treated Milk by Capillary Electrophoresis, 140, 3845–

- 1 3848.
- 2 Recio, I., García-Risco, M., López-Fandiño, R., Olano, A., Ramos, M. (2000).
3 Detection of rennet whey solids in UHT milk by capillary electrophoresis.
4 *International Dairy Science* 10 (2000) 333 – 338.
- 5 Rocha, R. A., Paiva, I. M., Anjos, V., Furtado, M. A. M., Bell, M. J. V. (2015).
6 Quantification of whey in fluid milk using confocal Raman microscopy and
7 artificial neural network. *J. Dairy Sci*, 98 (6), 3559–3567. [http://dx.doi.org/](http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8548)
8 10.3168/jds.2014-8548
- 9 Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Colnago, L. A. (2016). Detection and quanti fi
10 cation of milk adulteration using time domain nuclear magnetic resonance (TD-
11 NMR). *Microchemical Journal*, 124, 15–19.
12 <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.07.013>
- 13 Santos, P. M., Pereira-filho, E. R., & Rodriguez-saona, L. E. (2015). Rapid detection
14 and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and
15 chemometrics analysis. *Food Chemistry*, 138(1), 19–24.
16 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.024>
- 17 Sharma, K., & Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal, (July
18 2008), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s12571-009-0048-5>
- 19 Stadler, R. H., Tran, L. A., Cavin, C., Zbinden, P., Konings, E. J. M. (2016). Analytical
20 Approaches to Verify Food Integrity: Needs and Challenges, (9), 1135–1144.
21 <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0231>
- 22 Tähkääpää, S. Maijala, R., Korkeala, H., & Nevas, M. (2015). Patterns of food frauds
23 and adulterations reported in the EU rapid alert system for food and feed and in
24 Finland, 47. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.007>
- 25 Teixeira, L. V., Fonseca, L. M. (2008) Perfil físico-químico do soro de queijos
26 mozarela e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas
27 Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 60(1), 243-250.
- 28 Tripathy, S., Ghole, A. R., Deep, K., Rama, S., Vanjari, K., & Singh, S. G. (2017). A
29 comprehensive approach for milk adulteration detection using inherent bio-
30 physical properties as “ Universal Markers ”: Towards a miniaturized adulteration
31 detection platform. *Food Chemistry*, 217, 756–765.
32 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.037>
- 33 Tsimidou, M. Z., Ordoudi, S. A., Nenadis, N., Mourtzinos, I., Wakley, T., & Hassall, A.
34 H. (2016). *sophistication and its detection prevailed in parallel in those.*

- 1 *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd.
2 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00010-6>
- 3 Vieira, S. M., Souza, L. M. De, França, A. S., & Oliveira, L. S. (2015). FT-MIR-PLS as
4 a promising method for rapid detection of adulteration by waste whey in raw milk.
5 *Dairy Science & Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0247-0>
- 6 Yang, R., Liu, R., Dong, G., Xu, K., Yang, Y., & Zhang, W. (2016). Spectrochimica
7 Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy correlation spectroscopy
8 for discrimination adulterated milk. *SAA*, 157, 50–54.
9 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.12.017>
- 10 Zhang, J., Zhang, X., Dediu, L., & Victor, C. (2011). Review of the current application
11 of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. *Food*
12 *Control*, 22(8), 1126–1135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.019>
- 13 Zhang, L., Zhang, X., Ni, L., Xue, Z., Gu, X., & Huang, S. (2014). Rapid identification
14 of adulterated cow milk by non-linear pattern recognition methods based on near
15 infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 145, 342–348.
16 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.064>

1 **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2 Existe uma visível dificuldade, em se tratando da detecção de
3 adulterações por adição de soro de queijo no leite, já que os dois produtos possuem
4 grande semelhança físico-química. O desenvolvimento de técnicas rápidas e
5 confiáveis para este fim se faz necessário, já que se trata de uma adulteração que
6 ocorre com frequência.

7 A técnica padronizada para extração e quantificação dos
8 conservantes benzoato de sódio e sorbato de potássio no leite, obedece a
9 parâmetros preconizados pela ANVISA/ICH, teve desempenho superior ao método
10 oficial, e mostrou ser um método de fácil e rápida execução e com custos reduzidos,
11 considerando que utiliza pouca quantidade e apenas 1 reagente no preparo de
12 amostra. O método utilizado para o fim de detecção de adulteração por adição de
13 soro de queijo no leite demonstrou eficácia e inovação na metodologia, já que o
14 meio mais utilizado para este fim, a pesquisa pelo CMP, apresenta com frequência
15 resultados falso-positivos.

16 Percebe-se a grande necessidade do desenvolvimento de novas
17 metodologias e aperfeiçoamento dos métodos já existentes para todo o controle de
18 qualidade do leite, principalmente tratando-se da detecção de substâncias
19 adulteradoras, buscando garantir um produto inócuo e íntegro ao consumidor final.

20

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabelas contendo os resultados dos testes de crioscopia, pH e quantificação do benzoato de sódio.

Tabela 1. Análise do índice crioscópico ($^{\circ}\text{H}$) das 30 amostras de soro de queijo e amostras de leite experimentalmente adulteradas com diferentes proporções de soro (n=3)

Amostra	Soro	50%	20%	10%	5%	1%
01	-0,603±0,002	-0,574±0,002	-0,568±0,002	-0,551±0,001	-0,548±0,002	-0,545±0,001
02	-0,599±0,000	-0,572±0,001	-0,564±0,000	-0,560±0,000	-0,549±0,000	-0,545±0,000
03	-0,591±0,001	-0,568±0,000	-0,566±0,000	-0,552±0,000	-0,549±0,001	-0,545±0,001
04	-0,620±0,000	-0,585±0,001	-0,560±0,001	-0,550±0,001	-0,548±0,000	-0,545±0,000
05	-0,595±0,000	-0,569±0,000	-0,561±0,000	-0,548±0,000	-0,547±0,000	-0,543±0,002
06	-0,609±0,001	-0,577±0,000	-0,555±0,000	-0,551±0,001	-0,546±0,000	-0,545±0,000
07	-0,606±0,000	-0,577±0,000	-0,569±0,000	-0,556±0,000	-0,549±0,000	-0,546±0,000
08	-0,603±0,000	-0,575±0,001	-0,561±0,000	-0,552±0,000	-0,549±0,000	-0,547±0,002
09	-0,597±0,002	-0,573±0,001	-0,562±0,001	-0,559±0,000	-0,556±0,003	-0,547±0,000
10	-0,622±0,000	-0,586±0,000	-0,567±0,000	-0,555±0,000	-0,551±0,000	-0,545±0,001
11	-0,613±0,001	-0,580±0,003	-0,558±0,000	-0,551±0,000	-0,547±0,001	-0,546±0,001
12	-0,599±0,000	-0,570±0,000	-0,559±0,001	-0,555±0,000	-0,547±0,000	-0,545±0,000
13	-0,696±0,000	-0,570±0,002	-0,563±0,001	-0,550±0,000	-0,549±0,000	-0,546±0,002
14	-0,599±0,001	-0,575±0,000	-0,562±0,000	-0,560±0,002	-0,556±0,001	-0,546±0,000
15	-0,615±0,001	-0,579±0,001	-0,562±0,000	-0,552±0,000	-0,549±0,000	-0,545±0,000
16	-0,610±0,000	-0,577±0,000	-0,555±0,002	-0,549±0,001	-0,546±0,001	-0,545±0,001
17	-0,593±0,001	-0,564±0,000	-0,555±0,000	-0,550±0,000	-0,547±0,000	-0,546±0,000
18	ACIMA	ACIMA	ACIMA	ACIMA	-0,615±0,003	-0,557±0,001
19	-0,562±0,001	-0,554±0,003	-0,548±0,003	-0,542±0,001	-0,542±0,001	-0,541±0,001
20	ACIMA	ACIMA	ACIMA	ACIMA	-0,594±0,001	-0,553±0,002
21	-0,434±0,001	-0,482±0,001	-0,517±0,001	-0,531±0,001	-0,534±0,001	-0,539±0,002
22	-0,401±0,001	-0,467±0,001	-0,511±0,001	-0,524±0,001	-0,531±0,001	-0,538±0,002
23	ABAIXO	-0,434±0,001	-0,496±0,003	-0,518±0,001	-0,528±0,001	-0,537±0,001
24	ACIMA	ACIMA	-0,622±0,001	-0,582±0,001	-0,562±0,002	-0,545±0,002
25	ABAIXO	-0,422±0,001	-0,493±0,000	-0,514±0,002	-0,532±0,000	-0,539±0,000
26	ABAIXO	-0,444±0,001	-0,500±0,001	-0,519±0,001	-0,529±0,001	-0,537±0,001
27	ABAIXO	-0,440±0,001	-0,498±0,001	-0,534±0,001	-0,536±0,001	-0,538±0,001
28	ABAIXO	-0,459±0,001	-0,504±0,001	-0,524±0,001	-0,530±0,000	-0,537±0,000
29	-0,534±0,001	-0,538±0,001	-0,539±0,001	-0,538±0,001	-0,538±0,001	-0,539±0,001
30	ACIMA	ACIMA	-0,609±0,001	-0,573±0,001	-0,557±0,001	-0,542±0,000

ACIMA: Resultado acima da faixa de leitura do equipamento

ABAIXO: Resultado abaixo da faixa de leitura do equipamento

Crioscopia inicial do leite cru sem adulteração:

1 a 17: -0,545; **18 a 20:** -0,542; **21 a 23:** -0,543; **24 a 27:** -0,541; **28 a 30:** -0,538

1 **Tabela 2.** Análise do pH das 30 amostras de soro de queijo e amostras de leite
 2 experimentalmente adulteradas com diferentes proporções de soro

Amostra	Soro	50%	20%	10%	5%	1%
01	6,72	6,77	6,86	6,87	6,80	6,87
02	6,75	6,80	6,84	6,89	6,90	6,91
03	6,81	6,88	6,92	6,92	6,86	6,85
04	6,86	6,96	6,85	6,84	6,82	6,80
05	6,82	6,84	6,79	6,77	6,81	6,81
06	6,72	6,69	6,79	6,79	6,80	6,83
07	6,59	6,67	6,74	6,81	6,82	6,83
08	6,58	6,70	6,79	6,83	6,82	6,83
09	6,74	6,78	6,84	6,89	6,84	6,84
10	5,18	6,11	6,43	6,67	6,77	6,84
11	6,43	6,70	6,77	6,81	6,82	6,84
12	6,48	6,69	6,77	6,81	6,85	6,85
13	6,44	6,60	6,69	6,76	6,80	6,82
14	6,86	6,84	6,87	6,87	6,88	6,87
15	6,61	6,63	6,74	6,81	6,86	6,88
16	6,74	6,75	6,76	6,81	6,85	6,86
17	6,71	6,72	6,79	6,85	6,87	6,89
18	6,48	6,69	6,76	6,81	6,82	6,86
19	6,74	6,78	6,84	6,86	6,87	6,86
20	6,60	6,73	6,81	6,82	6,86	6,90
21	6,82	6,96	6,91	6,91	6,91	6,91
22	6,80	6,89	6,89	6,90	6,90	6,91
23	6,81	6,89	6,92	6,91	6,93	6,91
24	6,62	6,79	6,79	6,80	6,81	6,83
25	6,75	6,84	6,82	6,82	6,82	6,84
26	6,70	6,81	6,82	6,85	6,84	6,83
27	6,73	6,84	6,82	6,81	6,82	7,00
28	6,70	6,82	6,84	6,84	6,85	6,84
29	6,54	6,79	6,79	6,80	6,80	6,81
30	3,57	4,56	5,75	6,16	6,46	6,73

3 %: porcentagem de soro de queijo adicionado ao leite cru

4

5

pH inicial do leite cru sem adulteração:

6

7 **1 a 6:** 6,80; **7 a 13:** 6,84; **14 a 17:** 6,87; **18 a 20:** 6,85; **21 a 23:** 6,87; **24 a 27:** 6,79; **28 a**

8

30: 6,80

9

1 **Tabela 3.** Quantificação de benzoato de sódio em amostras de soro de queijo
 2 utilizadas na fraude de leite nas proporções 100%, 50%, 20%, 10%, 5% e 1%,
 3 empregando o método de HPLC-PDA proposto (n=2)

Amostra	100% soro	50% soro	20% soro	10% soro	5% soro	1% soro
	[benzoato de sódio] (mg L⁻¹) ± DP					
1	10,27 ± 0,00	4,75 ± 0,01	2,02 ± 0,05	0,99 ± 0,01	0,43 ± 0,02	N.D.
2	1,12 ± 0,05	0,51, ± 0,05	0,28 ± 0,04	N.D.	N.D.	N.D.
3	0,93 ± 0,05	0,45 ± 0,05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4	0,15 ± 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	0,22 ± 0,00	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	0,32 ± 0,01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	0,44 ± 0,00	0,26 ± 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8	5,83 ± 0,01	2,63 ± 0,02	1,02 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,27 ± 0,01	N.D.
9	1,54 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,24 ± 0,01	N.D.	N.D.
10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
13	4,55 ± 0,00	2,22 ± 0,01	0,83 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,24 ± 0,01	N.D.
14	1,75 ± 0,03	0,82 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,30 ± 0,01	N.D.	N.D.
15	16,94 ± 0,06	8,48 ± 0,01	3,24 ± 0,06	1,59 ± 0,02	N.D.	N.D.
16	33,42 ± 0,22	16,21 ± 0,35	6,42 ± 0,22	3,25 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,46 ± 0,01
17	7,17 ± 0,03	3,53 ± 0,06	1,66 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,31 ± 0,03	N.D.
18	21,46 ± 0,11	8,30 ± 0,25	4,84 ± 0,00	2,08 ± 0,03	1,11 ± 0,02	0,25 ± 0,00
19	48,49 ± 0,49	24,55 ± 0,75	11,78 ± 0,12	6,31 ± 0,06	3,14 ± 0,12	1,32 ± 0,02
20	13,59 ± 0,48	7,54 ± 0,26	3,94 ± 0,15	2,29 ± 0,01	1,31 ± 0,04	0,61 ± 0,02
21	59,06 ± 2,53	31,64 ± 0,16	13,76 ± 0,20	4,09 ± 0,10	3,33 ± 0,03	1,68 ± 0,06
22	42,51 ± 0,62	23,21 ± 0,56	10,44 ± 0,20	5,76 ± 0,03	3,13 ± 0,01	1,34 ± 0,03
23	25,55 ± 0,13	13,90 ± 0,57	6,28 ± 0,09	3,78 ± 0,12	2,03 ± 0,01	0,90 ± 0,02
24	21,74 ± 0,44	12,09 ± 0,06	5,23 ± 0,08	4,82 ± 0,05	3,04 ± 0,00	0,80 ± 0,01
25	39,87 ± 1,02	15,02 ± 0,57	5,71 ± 0,11	3,52 ± 0,02	2,74 ± 0,04	1,15 ± 0,02
26	27,64 ± 0,56	16,53 ± 0,32	6,64 ± 0,16	4,37 ± 0,04	2,17 ± 0,06	1,11 ± 0,01
27	44,24 ± 0,44	17,12 ± 0,08	8,25 ± 0,27	5,06 ± 0,12	3,84 ± 0,04	2,08 ± 0,05
28	33,85 ± 0,98	17,42 ± 0,53	7,56 ± 0,07	4,45 ± 0,14	2,42 ± 0,01	1,04 ± 0,03
29	1,34 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,69 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,32 ± 0,00	N.D.
30	33,62 ± 0,97	15,87 ± 0,65	8,28 ± 0,38	5,54 ± 0,19	3,58 ± 0,02	1,45 ± 0,06

4 D.P.: desvio padrão da duplicata. N.D.: não detectado