

**DETERMINAÇÃO DE GMP E CMP* NO LEITE POR MÉTODOS
ESPECTROFOTOMÉTRICO (ANSM) E CROMATOGRÁFICO (HPLC) –
PARÂMETROS METODOLÓGICOS
(*Glicomacropéptido e Caseinomacropéptido)**

Luiz Francisco Prata¹, Camila Barbieri Prata²

¹ FCAV - Unesp

² FCAVJ - Unesp

Correspondência: Luiz Francisco Prata: lfprata@netsite.com.br

RESUMO: O Glicomacropéptido é liberado pela renina durante a coagulação do leite. Com 64 resíduos de aminoácidos, glicosilação heterogênea, com formas não glicosiladas (CMP) e glicosiladas (GMP), por seu PM ou hidrofília, permanece solúvel. No leite sua concentração é baixa, enquanto no soro passa de 1200 a 1600 mg/L, com aumento de 12 a 16 vezes. Isso possibilita que seja utilizado como marcador para condições anormais e fraudulentas do leite ou na monitoração da proteólise na produção de queijos. A padronização de um método espectrofotométrico quantitativo (ANSM) possibilitou sua determinação rápida. Em função das variações na glicosilação da κ -caseína durante o período de lactação, ou em decorrência de mastites, ou ainda de alterações proteolíticas de origem microbiana, há necessidade desse prévio conhecimento para a utilização potencial do método. Objetivou-se a definição de parâmetros necessários à correta interpretação dos resultados por meio do conhecimento da variabilidade da matéria-prima, do produto industrializado (HTST ou UHT) e da intercorrespondência entre formas glicosiladas e não glicosiladas. Verificou-se que sua distribuição no leite de conjunto apresentou variabilidade restrita, com média de $A_{470nm} = 0,232 \pm 0,088$ ou $3,89 \pm 1,25$ mg de ácido siálico/L, com limite superior em $A = 0,496$, excluindo da normalidade quaisquer valores superiores a esse.

Palavras-chave: análises; fraude; interpretação; proteólise; soro de queijo

**DETERMINATION OF GMP AND CMP IN MILK BY SPECTROPHOTOMETRIC –
ANSM, AND BY CHROMATOGRAPHIC – HPLC, METHODS -
METHODOLOGICAL PARAMETERS**

ABSTRACT: Glycomacropéptide is a glycosilated fraction of bovine kappa-casein that remains soluble when milk is clotted by rennin. Determinations of milk sialic acid content are useful because its concentration reflects the amount of free GMP of milk. In normal milk these amounts are very low, 12 to 16 times lower than in sweet whey. Therefore, its determination may be applied to verify possible frauds with whey addictions, since it works as a fingerprint. With the description of a new spectrophotometric method for determination of free GMP (ANSM) occurred a simplification of procedures, being faster than others (HPLC method), without loss of accuracy. However, due to variations of glycosilation in kappa-casein between animals, during the lactation period, due to mastitis and yet due to proteolysis on milk, it was necessary to know these variations to interpret correctly the analytical results. It was analyzed 1,703 samples of producer's raw milk and 1,189 samples of processed milk (HTST and UHT). The results showed that normal milk from herd (producer's milk) have only small amounts of free GMP, with $A_{470nm} = 0.232 \pm 0.088$ or 3.89 ± 1.25 mg of sialic acid/L. The upper limit of this distribution was $A = 0.496$; thus every bigger value may represent a problem, being outside of normal distribution.

Key Words: analysis; fraud; interpretation; milk proteolysis; sweet whey

INTRODUÇÃO

O leite é um dos poucos exemplos de um composto naturalmente criado para servir de alimento assim também reconhecido pela humanidade. Durante a fase inicial da vida dos mamíferos, como alimento único, supre as necessidades de adaptação do filhote a um novo ambiente e seu rápido crescimento. Consequentemente, não pode ser invariável, pois variam tanto as necessidades intrínsecas do recém-nascido quanto as extrínsecas, relacionadas ao ambiente onde se encontram mãe e filhote. Passando diretamente de um para outro pela amamentação, assegura a nutrição desse, evita desperdício e, principalmente, a existência de competidores, garantindo a sobrevivência e perpetuação da espécie. Entretanto, o mesmo não se encontra preparado para permanecer ou sofrer as consequências de um ecossistema aberto (Prata, 2001, 2002).

A obtenção e usos do leite, a partir da exploração econômica, quebram a primeira regra fundamental, pois torna necessário ordenhar animais e expor o produto a um ecossistema aberto. Derivam daí os problemas e dificuldades para a manutenção das suas características e propriedades (Prata, 2002).

Como matéria-prima é fundamental que o leite tenha qualidade, entendida como um conjunto de características próprias, adicionadas de outras inerentes ao sistema de produção, que garantam atendimento às expectativas de consumo ou industrialização. A própria definição de leite contempla sua variabilidade, referindo-o como a secreção obtida da ordenha completa e ininterrupta de uma ou mais vacas sadias durante o período normal de lactação, contendo não menos que 8,25% de sólidos desengordurados e não menos que 3,25% de gordura

(Farrel *et al.*, 2004; Prata, 2001; Wong *et al.*, 1999).

Fraudes e falsificações de alimentos coexistem a perder-se no tempo. Na comercialização do leite não é diferente. Enquanto algumas são simples, de fácil detecção e comprovação, outras se revestem de complexidade e sofisticação, dificultando sua detecção ou inserindo dúvidas quanto às possíveis respostas de procedimentos analíticos (Prata, 2002). Uma das fraudes mais preocupantes na atualidade é a substituição de parte do leite por soro oriundo da coagulação enzimática da produção de queijos, que se enquadra na segunda categoria, revestindo-se de alguma sofisticação tecnológica e, ao utilizar um derivado do próprio leite, impõe dificuldades à sua detecção e coibição (Alcázar-Montañez *et al.*, 2000; Galindo-Amaya *et al.*, 2006; Hafisa *et al.*, 2002; Li e Mine, 2004; Oancea, 2009).

Leites para consumo têm a finalidade de servir de alimento. Ao serem fraudados, impõem prejuízo econômico ao consumidor e, principalmente, têm seu valor nutritivo limitado e suas intenções de uso desqualificadas. Nas fraudes com substituição de leite por soro, a cada 10% de soro adicionado resulta em redução de aproximadamente 8% no teor de proteínas, principalmente das caseínas e consequentemente de fosfato de cálcio. Ao invés de 3,5%, o leite passa a ter aproximadamente 3,2% de proteínas; com 20% apenas 2,9%; com 30% apenas 2,6% e assim por diante. Essa fraude reveste-se de caráter criminoso ao, deliberadamente, privar níveis nutricionais esperados, necessários e pelos quais o consumidor está remunerando integralmente (Prata, 2002).

Por outro lado, a tecnologia disponível e a própria legislação possibilitam a utilização do soro em

inúmeras condições legais (MAPA, 2007). Apesar disso, há evidências de que as fraudes com utilização de soro sejam comuns, ocultando-se na rapidez de consumo dos leites pasteurizados, na má qualidade da matéria-prima utilizada em processos UAT e nas dificuldades metodológicas dos laboratórios de controle (Prata, 2002). Esse tipo de fraude deixa uma "impressão digital", que é a presença de GMP ou Glicomacropéptido, liberado da κ -caseína quando da coagulação enzimática pela renina, o qual permanece solúvel no soro (Brody, 2000; Fox, 1989; MeMahon e Brown, 1984; Shammet *et al.*, 1992; Walstra, 1990).

O GMP e o CMP constituem a base da maior parte dos métodos desenvolvidos para detectar e coibir a fraude por soro, entre eles o HPLC ou CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (Alcázar-Montáñez *et al.*, 2000; Brody, 2000; Fukuda *et al.*, 1994; 1996; 2004; Galindo-Amaya *et al.*, 2006; Hafisa *et al.*, 2002; Li e Mine, 2004; Oancea, 2009; Prata, 2009). Apesar das qualidades, o CLAE é caro e demorado, não estando disponível na maioria dos laboratórios. Alternativamente, com base na presença de ácido siálico (NANA - N-acetyl Neuraminic Acid) na molécula de GMP, descreveu-se um método espectrofotométrico na região visível do espectro que se mostrou efetivo, rápido e barato. Comparado experimentalmente ao CLAE, ofereceu excelente correlação ($r = 0,996$) (Fukuda *et al.*, 1994, 1996, 2004; Prata, 2009).

Ambas as técnicas (CLAE E ANSM) fazem parte da metodologia analítica oficial, respectivamente para quantificação de CMP e de GMP (MAPA, 2006). Para quaisquer desses métodos um importante fator dificulta a correta interpretação dos resultados. Trata-se da presença de quantidades variáveis e oscilantes de GMP e CMP

livres na própria matéria-prima que, ao se desconhecer sua distribuição normal e variabilidade, torna impraticável a interpretação dos resultados obtidos.

Este trabalho objetivou determinar essas distribuições e suas variações, tanto para a matéria-prima (leite), em condições usuais de obtenção e amostragem significativa, como também para produtos processados (leites pasteurizados). A hipótese fundamenta-se no conhecimento dessas distribuições para que, correlacionadas aos padrões de fraudes por adição de soro, possa permitir a interpretação dos resultados analíticos com correta inferência de pontos de corte e minimização de falso-positivos e falso-negativos, possibilitando adequado esquema de interpretação e adoção ou emprego seguro de métodos baseados na presença e quantificação de GMP livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes - Ácido siálico (Sigma), Ninidrina (Merck, Riedel), Ácido Clorídrico P.A (Merck), Ácido Acético Glacial (Merck), Ácido Tricloroacético 24% (Merck), Ácido Sulfúrico 0,1N (Synth), Ácido Fosfotúngstico 20% (Nuclear), Etanol 95% (Merck), Acetona (Merck), entre outros. Ninidrina Ácida: Reagente 2 de Gaitonde – formulação: 1 g de Ninidrina, 16 mL de Ácido Clorídrico PA e 24 mL de Ácido Acético glacial (estocada em frasco escuro, sob refrigeração, por até uma semana).

Amostras - Foram coletadas, de diferentes locais e procedências, 4.302 amostras de leite durante o período de quatro anos, até completarem-se as amostragens necessárias à significância dos universos pretendidos [leite cru de qualidade variável (frascos em duplicata com cerca de 450 mL cada), leite de carretas (*idem*) e leites pasteurizados de consumo (HTST e UHT – três embalagens fechadas)]. Além dessas,

com o intuito de constatar a variabilidade e o comportamento de fraudes por adição de soro ao leite, foram analisadas também 87 amostras de soro industrial. No laboratório, as amostras foram submetidas à análise, em duplicatas, para determinação do teor de GMP livre por meio de método espectrofotométrico na região visível (ANSM).

Métodos - Ninidrina Ácida (ANSM – Acidic Ninhydrin Spectrophotometric Method) - A cada 15 mL de amostra de leite foram acrescentados, sob agitação, 15 mL de solução de TCA a 24%. Após repouso de 30 minutos a mistura foi filtrada. Em duplicatas, 10 mL desse filtrado foram depositados em tubos de centrifuga previamente tarados, adicionando-se 1 mL de solução de PTA a 20% (Ácido Fosfotúngstico). A mistura foi centrifugada a 2000 g (3.500 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, evitando-se a perda do sedimento. O sedimento foi redisperso em 6 mL de etanol 95%, seguido de nova centrifugação durante 10 minutos. Utilizando-se apenas o sedimento, a cada tubo foram adicionados 2 mL de ácido acético glacial e 1 mL do reagente de ninidrina ácida, homogeneizados e submetidos a banho-maria fervente (forte) por exatos 10 minutos. Na presença de NANA (ou GMP) há desenvolvimento de cor variando do amarelo claro (dourado) ao marrom-amarelado (castanho escuro). Após o aquecimento a mistura foi resfriada em banho de água e gelo e levada à leitura da absorvância a 470nm, as quais foram transformadas em concentração ($\mu\text{gNANA/mL}$ ou mg/L) utilizando-se curva-padrão previamente elaborada (Fukuda *et al.*, 2004).

Curva-padrão – utilizando a mesma metodologia, com diluição seriada de concentrações conhecidas de ácido siálico puro (Sigma) e em triplicata,

foram determinados os pontos da curva-padrão.

Análise estatística - Os resultados, suas distribuições, comportamento da Distribuição Normal e seus determinantes, médias, medianas, moda, desvios-padrão, coeficientes de variação, estimativas de correlações (Pearson) e comparações de significância, foram analisados com o auxílio do pacote contido no software Statistica 6.0 (StatSoft Ltd – Bedford, UK).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variabilidade individual - A primeira distribuição avaliada foi a referente à variação individual, para animais em período normal de lactação. Foram analisadas 980 amostras, as quais evidenciaram média com baixo teor de GMP livre ($A_{470\text{nm}} = 0,235$ ou $3,93 \text{ mg de ácido siálico/L}$), mediana muito próxima, de $0,210$ ou $3,48 \text{ mg/L}$, mas com ampla variação e desvio-padrão elevado (Tabela 1).

Tabela 1 – Síntese dos resultados da determinação espectrofotométrica de GMP livre (ácido siálico – ANSM) para os diferentes segmentos amostrais de leite cru, leite processado industrialmente e soro industrial de coagulação enzimática.

Amostragem	Resultados para o Método Espectrofotométrico (ANSM)			
	Tipos de Amostra	Absorvância Média $A_{470\text{nm}}$	Desvio-padrão da Média $A_{470\text{nm}}$	Concentração de Ácido Siálico (mg/L)
Leite cru individual (por animal)	980	0,235	0,180	3,93
Leite cru de conjunto (rebanho)	1.703	0,232	0,088	3,89
Leite cru de Carretas (Spot milk)	237	0,349	0,210	6,03
Leite cru (Segmento problema)	193	0,441	0,372	7,72
Leite pasteurizado tipo A	30	0,180	0,036	2,93
Leite pasteurizado tipo B	285	0,229	0,051	3,83
Leite pasteurizado tipo C	636	0,253	0,083	4,27
Leite pasteurizado tipo UAT	238	0,399	0,210	6,95
Soro industrial	87	2,122	0,764	38,57

Essa distribuição evidenciou que 96,8% dos resultados situaram-se abaixo de $A_{470\text{nm}} = 0,500$ ou $8,80\text{mg/L}$, com um desvio à direita, e com apenas 31 resultados (3,2%) com valores dispersos e superiores a esse limite. Isso parece coerente com as

observações da literatura (Furlanetti e Prata, 2003), sendo que esses poucos resultados sujeitos a maior dispersão possivelmente sejam provenientes de leites de animais com alterações fisiológicas ou patológicas de secreção, prolongamento de período de lactação e animais velhos ou com maior número de parições.

Variabilidade do leite cru de conjunto- O leite recebido pelas indústrias é o produto de conjuntos de animais em lactação. Para os objetivos pretendidos, é desse tipo de universo que as amostras devem ser tomadas, pois sua variabilidade é menos sujeita a variações individuais.

Essa distribuição assumiu a maior importância, pois foi dela que se puderam extrair informações acerca da normalidade ou anormalidade dos resultados, motivo pelo qual trabalhou-se com um universo amostral amplo e significativo. Conforme esperado, a distribuição mostrou menor dispersão, com resultados médios muito próximos dos determinados para a anterior (variabilidade individual).

A média observada foi de $A_{470nm} = 0,232$ ou $3,89$ mg de ácido siálico/L, com desvio-padrão de $A_{470nm} = 0,088$ ou $1,25$ mg/L. Acrescida de um desvio-padrão (68% da distribuição normal) resultou em $A = 0,320$ ou $5,50$ mg/L e abrangeu 88,0% dos resultados. A média mais dois desvios-padrão (95%) resultou em $A = 0,410$ ou $7,15$ mg/L, englobando 95,6% dos resultados. Finalmente, a média mais três desvios-padrão (99%) resultou em $A = 0,500$ ou $8,80$ mg/L, abrangendo 98,5% dos resultados, equivalendo-se ao valor teórico.

Variabilidade do leite transportado por carretas - O leite transportado em carretas (spot-milk) é matéria-prima adquirida em localidades ou bacias leiteiras distantes, geralmente de outros estados como Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e

noroeste do Paraná. Antes restrita a algumas companhias, na atualidade, face à migração de parte dos produtores para o centro-oeste, até pequenas unidades recorrem a essa prática.

Essa produção se enquadra nos padrões de obtenção do leite tipo C, com produtores dispersos, nem sempre contando com recursos e suportes à produção necessários à qualidade para um produto tão perecível. Via de regra, o leite sofre as consequências de transportes e resfriamentos sucessivos, sempre demorados, sob agitação e sob sol e calor. Na chegada ao destino, muitas das suas propriedades e características já se encontram substancialmente alteradas. Esses motivos, aliados à crescente utilização dessa matéria-prima na obtenção de produtos UAT, motivaram a constituição desse segmento amostral, justamente para verificar seu efeito sobre a possível liberação de GMP.

Foram analisadas 237 amostras e, apenas levando-se em conta a média e a mediana, já se verificaram diferenças significativas em relação aos valores determinados para leite de conjunto. Essa média saltou para $A = 0,349$ (50,4% maior), com um grande desvio-padrão ($A = 0,210$), verificando-se uma distribuição diversa da anterior. A título de exemplo, enquanto na primeira, 81,1% dos resultados situaram-se abaixo de $A = 0,300$, nesta houve apenas 40,1% dos resultados situando-se abaixo desse mesmo valor.

Variabilidade de amostras de situações-problema - Para complementar as possibilidades de variação na liberação de GMP, com base na literatura, buscou-se uma situação problema englobando algumas das principais causas de liberação de GMP, quais sejam: a ocorrência de mastites clínicas ou subclínicas, de modo persistente ou em proporção significativa para o conjunto; o indevido prolongamento do período de lactação

com omissões de intervalos entre lactações e a produção extrativista de pequenos produtores com poucos animais e graves problemas higiênico-sanitários (Leitner *et al.*, 2006; Saeman *et al.*, 1988; Walstra, 1990).

Para esse universo foram analisadas 193 amostras, cuja média saltou para $A = 0,441$ (90% maior que a de leite de conjunto), com desvio-padrão de $A = 0,372$, caracterizando dispersão e diferenças significativas.

Verificou-se progressivo aumento no teor de GMP livre respectivamente para leite cru de conjunto (3,89 mg/L), leite cru individual (3,93 mg/L), leite transportado por carretas (6,03 mg/L) e segmento de leite com problemas (7,72 mg/L) (Tabela 1 e ilustração comparativa na Figura 1).

A liberação de GMP ocorre, sabidamente, por ação proteolítica sobre a fração κ -caseína (Fox, 1989; Haddadi *et al.*, 2005; Shammet *et al.*, 1992; Walstra, 1990). A ampliação gradativa da liberação denota a existência significativa de problemas em algumas dessas distribuições que, em regra, estariam possibilitando extensa proteólise, mesmo em leite refrigerado.

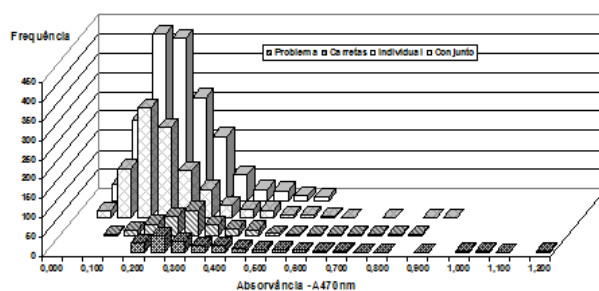


Figura 1 - Distribuição das frequências dos resultados por intervalos de Absorvância (A_{470nm}) para as amostragens de leite cru individual (cada animal), de conjunto (rebanho), transportado por carretas e do segmento "problema".

Essa proteólise pode englobar origens e mecanismos diferentes em função das condições de obtenção e estocagem antes do processamento industrial, desde a ação de proteases nativas como a Plasmina (Shammet *et al.*, 1992a, b; Walstra, 1990), proteólise

microbiana inespecífica em leites de má qualidade estocados em temperaturas marginais (Haddadi *et al.*, 2005; Janstová *et al.*, 2006; Leitner *et al.*, 2006), assim como a proteólise microbiana devida ao desenvolvimento de espécies psicrófilas (Prata, 2001).

Variabilidade do leite processado termicamente - Foram analisadas 951 amostras de leites pasteurizados (Figura 2), cuja média foi $A = 0,243 \pm 0,075$, correspondendo a $4,09 \pm 1,01$ mg de NANA/L, média esta próxima à determinada para leite cru de conjunto. A Figura 3 evidencia a mobilidade desse universo comparada com os resultados para leite cru.

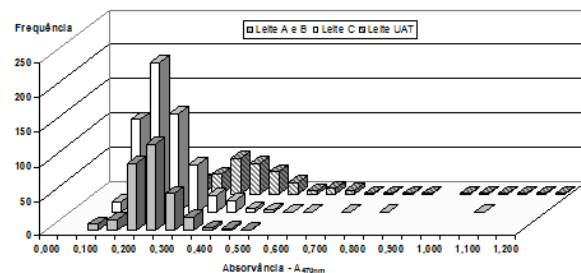


Figura 2 - Distribuição das frequências dos resultados por intervalos de Absorvância (A_{470nm}) para as amostragens de leites termicamente processados dos tipos A e B, tipo C e UAT.

Desses, o tipo A foi o de menor amostragem (30); entretanto, por sua pouca variabilidade, permitiu demonstrar os objetivos pretendidos, relacionados aos cuidados e à rapidez de transformação da matéria-prima. A média foi de $A = 0,180 \pm 0,036$ ou $2,93 \pm 0,29$ mg/L, a menor de todas as distribuições, com nenhum dos resultados superior a $A = 0,300$, ou seja, o maior valor observado foi $A = 0,266$ ou 4,51 mg/L.

Com amostragem intermediária, foram analisadas 285 amostras de leite tipo B, também diferenciado em termos de qualidade e cuidados de conservação. Apesar de mostrar variabilidade ligeiramente maior, em geral confirmou a tendência observada para o leite tipo A. Evidenciou-se, mais uma vez, um valor baixo para a média,

de $A = 0,229 \pm 0,051$ ou $3,83 \pm 0,57$ mg/L, com mediana muito próxima.

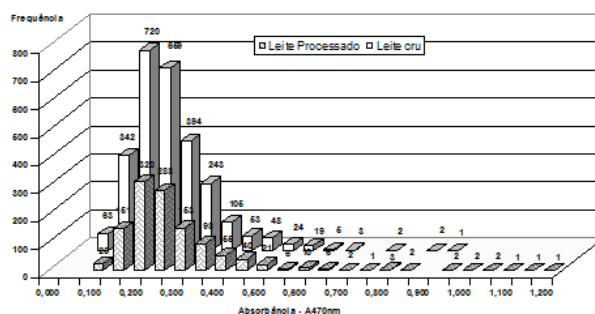


Figura 3 - Distribuição das frequências dos resultados por intervalos de Absorvância (A_{470nm}) para as amostragens de leites termicamente processados em comparação a leite cru.

Para leite pasteurizado tipo C foram analisadas 636 amostras e, conforme pressuposto, tanto os resultados foram superiores quanto maior foi sua dispersão. A média determinada foi de $A = 0,253 \pm 0,083$ ou $4,27 \pm 1,15$ mg/L, superior à observada para o tipo A e ligeiramente superior à do leite B e à do leite cru de conjunto. Pelo “n” expressivo, não é a média que mais chama atenção, mas sim o desvio-padrão, com distribuição ampliada, possivelmente denotando precariedade e falta de cuidados com esse tipo de leite.

O leite processado por UAT sempre constituiu universo à parte devido aos problemas de instabilidade durante sua validade (Janstová *et al.*, 2006). Desse tipo de leite processado foram analisadas 238 amostras, observando-se que a média foi $A = 0,399$ ou $6,95$ mg/L de ácido siálico ou GMP livre, grande desvio-padrão, de $A = 0,210$ ou $3,48$ mg/L e mediana elevada, de $0,315$ ou $5,41$ mg/L. Essa média foi 74% maior que a observada para leite pasteurizado tipo B, 58% maior que a do leite tipo C e 72% maior que a determinada para leite cru de conjunto. Quando comparada à distribuição do leite cru transportado por carretas, as distribuições mostraram maior semelhança e aproximação de valores, com a média do processado apenas 14% superior a essa.

Soro de queijos e fraudes controladas - Para fundamentar as possíveis relações advindas de fraudes por adições desconhecidas de soro ao leite, determinando com confiabilidade os pontos de corte para a interpretação dos resultados, tornou-se fundamental o conhecimento da distribuição de GMP livre em soro de queijos de coagulação enzimática utilizando matérias primas semelhantes (das mesmas regiões das amostras) e da resposta às adições crescentes de soro ao leite. Para o primeiro propósito foram analisadas 87 amostras de soro industrial, obtendo-se uma média equivalente a $A = 2,122$ ou $38,57$ mg/L e um desvio-padrão de $A = 0,764$ ou $13,65$ mg/L.

Para a segunda, em triplicatas e com amostras de soro e leite muito próximas às das médias determinadas para leite de conjunto e para soro industrial, foram realizados ensaios de fraudes variando os percentuais de adição desde 2,5% até 60,0% de soro. A adição de 5,0% de soro elevou o resultado da determinação para a faixa de $A = 0,330$. Esse valor, se comparado à distribuição obtida para leite de conjunto (mais representativo e sujeito a menor variabilidade), englobaria mais de 82% dos seus resultados, restando apenas 18% que se situaram acima desse valor. Se a mesma comparação for realizada com os universos dos leites tipos A e B, que, embora pasteurizados denotam matérias-primas mais bem conservadas, verifica-se que engloba 100% dos resultados para o tipo A e mais de 92,0% para o tipo B. Isso significa que, para as técnicas que utilizam a pesquisa de GMP ou CMP livres, tais métodos têm poder discriminatório, entre leites fraudados e não fraudados, quando a adição substitutiva por soro for entre 6,0 e 7,5%.

A adição de 15,0% de soro resultou em valores próximos de $A = 0,520$. Do mesmo modo, relacionando-

se aos da distribuição obtida para a matéria-prima, mostra que cerca de 99,0% desses seriam inferiores a essa cifra, com probabilidade menor que 1,0% de pertencerem à distribuição. Esse raciocínio pode ser confirmado na comparação dos resultados obtidos para os leites pasteurizados tipos A e B, em que nenhuma das 315 amostras superou a faixa de $A = 0,500$.

Exercer o mesmo raciocínio para leites tipo C, UAT, de carretas ou leites problema, além de desnecessário poderia configurar-se numa impropriedade, haja vista que, apesar de constituir-se no tipo predominante, sabidamente abrigam inúmeros problemas, muitos deles que poderiam influenciar na liberação de GMP. Mesmo com essas ressalvas, utilizando-se a distribuição obtida para leite pasteurizado tipo C, verificou-se que mais de 80,0% das amostras mostraram resultados inferiores a $A = 0,330$, e que mais de 98,0% dos resultados se mantiveram abaixo de $A = 0,520$.

Parâmetros de interpretação - Utilizando a análise desses universos e suas interrelações procurou-se definir os pontos de corte para a interpretação dos resultados de métodos que utilizam a determinação de GMP livre, classificando as respostas em faixas correspondendo a resultados Negativos, Suspeitos ou Positivos com relação à possível adição de soro ao leite.

A análise de GMP por CLAE (HPLC) faz parte da legislação da União Européia (Apêndice IV, L. 228 2426/90). Hafisa *et al.* (2002), trabalhando a fraude de leite em pó com adições controladas de soro em pó, obtiveram correlação linear entre as quantidades de soro adicionadas e o teor de GMP utilizando a técnica de HPLC, com $r = 0,91$ e equação $y = 1851,1x + 11328$, na qual o x correspondeu ao percentual de adição, de zero a 25%, e o valor de b (11328) à altura do pico na interseção do valor zero com o eixo y . Pela reta

obtida, verifica-se que, para 5% de soro a altura do pico situou-se em 20633; para 7,5% de soro em 25311 e para 10% de soro em 29839. O valor de b variou, portanto, em função do leite utilizado e sobre o qual a fraude se realizou, caracterizando uma quantidade variável de GMP de leite para leite, fazendo com que esse ponto apresente certa mobilidade.

Prata (2002, 2009), no Brasil, trabalhando a equivalência entre o método espectrofotométrico para determinação de GMP e o método CLAE para quantificação de CMP obteve resultados muito parecidos com os citados. Para leite normal e bem conservado observou que a altura do pico de CMP na técnica de CLAE pode chegar a 12100, um valor muito próximo ao de 11328 citado como valor de b no trabalho apresentado por Hafisa *et al.* (2002). Para fraude controlada de 5% de soro, equivalendo a 5,61 mg/L de ácido siálico, constatou altura de pico de CMP de no mínimo 17000. Para 10% de soro, equivalendo a 7,36 mg/L de ácido siálico, o pico seria de no mínimo 28000. Esses valores foram tratados como mínimos em função da variabilidade dos teores de GMP e de CMP, tanto no leite quanto no soro.

Dessas relações, para o método espectrofotométrico a 470nm, utilizando-se a solução de TCA a 12% para a separação unicamente das formas glicosiladas, o universo **Negativo** tem poder de discriminação se aceitar como resultados normais valores de até $A = 0,300$ ou menos que 5,14 mg de NANA/L de leite na forma de GMP livre e altura de pico de até 14000 para CMP (Figuras 4 e 5). Valores superiores a $A = 0,451$ ou maiores que 7,89 mg/L, ou altura de pico de CMP superior a 31000, com segurança e confiabilidade, seriam resultantes de fraudes ou falsificações, e portanto **Positivos**, ou ao menos, decorrentes de condições extremas e indesejáveis de obtenção,

transformação e conservação da matéria-prima.

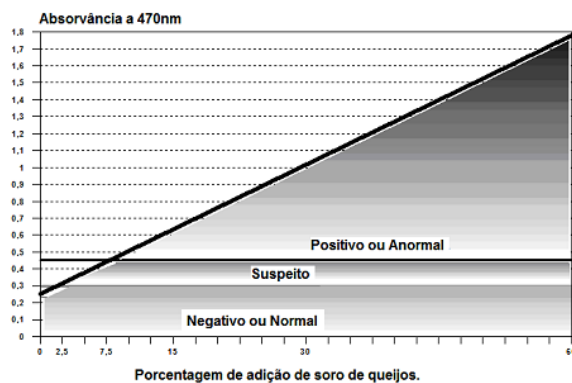


Figura 4 - Relações dos pontos de corte determinados para o método espectrofotométrico (ANSM) com relação à absorvância (A_{470nm}) e o percentual de adição de soro ao leite.

O intervalo de resultados entre $A = 0,301$ e $A = 0,450$, correspondendo a 5,15 e 7,89 mg/L, e entre 14000 e 31000 para CMP, dadas as imprecisões decorrentes da interseção de parte dos universos de leites normais e fraudados, deve ser trabalhado na categoria de Suspeitos, cuja discriminação só poderá advir do conhecimento e aplicação sistemática de controles ou da associação conjunta da determinação de outros parâmetros.

Esses mesmos intervalos, agora para o método de CLAE, definidos pela correlação entre os métodos, mostraram valores <14.000 para a faixa de resultados Negativos, entre 14.001 e 31.000 para os Suspeitos e >31.000 para a faixa de resultados seguramente Positivos (Figura 5).

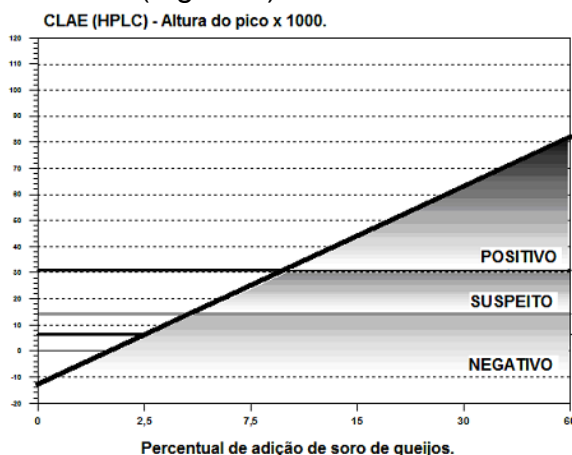


Figura 5 - Relações dos pontos de corte determinados para o método cromatográfico - CLAE (HPLC) com relação à absorvância (A_{470nm}) e o percentual de adição de soro ao leite.

Deve-se ressaltar que tanto CMP quanto GMP não constituem produtos finais (*end-point*) de ação proteolítica, sendo eles próprios sujeitos à hidrólise e associação (Mikkelsen *et al.*, 2005; Shammet *et al.*, 1992b).

Definir esses pontos de corte para universos nem sempre distintos e com partes expressivas sujeitas a interseções não é tarefa fácil nem de opção única, pois, apesar da segurança e confiabilidade estatística, depende muito mais do conhecimento e controle inerente a cada situação e dos propósitos de controle. Assim, a movimentação desses pontos de corte para a esquerda, restringindo os intervalos de variação para as categorias, faz aumentar o número de suspeitos e de falso-positivos. Por outro lado, sua movimentação para a direita, separando mais os universos normal e fraudado, resulta na aceitação, como normais, de muitos resultados suspeitos e mesmo positivos para a presença de soro, aumentando o número de falso-negativos.

CONCLUSÃO

As inter-relações determinadas para diferentes segmentos amostrais, associadas a estudos controlados de fraude por adição de soro ao leite, permitiram a definição de parâmetros de interpretação para os métodos espectrofotométrico (ANSM) e cromatográfico (HPLC) para a quantificação respectiva de GMP e CMP livres no leite. Assim, para o primeiro, entende-se como anormal a presença de ácido siálico >7,89 mg/L de leite ($A_{470nm} > 0,451$), enquanto para o segundo esse limite situou-se em frequência ou altura de pico >31.000.

REFERÊNCIAS

- ALCÁZAR MONTAÑEZ, C. D.; RAMIREZ, J. R.; JARAMILLO ARANJO, C. J. *et al.* Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. **Veterinaria México**, v.31, n.3, p. 217-22, 2000.
- BRODY, E. P. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **British Journal of Nutrition**, v.84, Suppl.1, p.39-46, 2000.
- FARREL, H. M. *et al.* Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.6, p.1641–1674, 2004.
- FOX, P. F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.1379 -1400, 1989.
- FUKUDA, S. P., RÖIG, S. M.; PRATA, L. F. Metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico no leite. **Anais do XII Congresso Nacional de Laticínios**: p. 114-120. Juiz de Fora, MG. 1994.
- FUKUDA, S. P., RÖIG, S. M.; PRATA, L. F. Aplicação do método da ninidrina ácida como teste de “screening” de plataforma para detecção da adição de soro ao leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SBCTA - Campinas, v.16, n.1, p.52-56, 1996.
- FUKUDA, S. P.; RÖIG, S. M.; PRATA, L. F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. **Le Lait**, v. 84, n. 5, p. 501–512, 2004.
- FURLANETTI, A. M.; PRATA, L. F. Free and total GMP (glycomacropeptide) contents of milk during bovine lactation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 121-125. 2003.
- GALINDO-AMAYA, L. M.; VALBUENA-COLMENARES, E.; ROJAS-VILLARROEL, E. Estandarización de la detección del Glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Revista Científica FCV-LUZ**, v. 16, n.3, p. 308 - 314, 2006.
- HADDADI, K.; MOUSSAOUI, F.; HEBIA, I.; LAURENT F.; Le ROUX, Y. *E. coli* proteolytic activity in milk and casein breakdown. **Reproduction Nutrition Development**, n. 45, p. 485–496. 2005.
- HAFISA, E.; NILÜFER, D.; BOYACIUGLU, D. Detecting adulteration of milk powder with whey powder. **26º. IDF World Dairy Congress**, Paris, 24 – 27 September, 2002.
- JANSTOVÁ, B.; DRACKOVÁ, M.; VORDOVÁ, L. Effect of *Bacillus cereus* Enzymes on the Milk Quality following Ultra High Temperature Processing. **Acta Veterinaria Brno**, v. 75, n. 4, p. 601–609; 2006.
- LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U., *et al.* Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 648–654. 2006.
- LI, E. W. Y.; MINE, Y. Technical Note: Comparison of Chromatographic Profile of Glycomacropeptide from Cheese Whey Isolated Using Different Methods. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p.174–177. 2004.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 51**, de 18/09/2002. Disponível em: <http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em 14 dez. 2007.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 68**, de 12/12/2006. Disponível em: <http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegis>. Acesso em 15 dez. 2009.
- MeMAHON, D. J.; BROWN, R. J. Enzymic Coagulation of Casein Micelles: A Review. **Journal of Dairy Science**, v.67, p. 919-929, 1984
- MIKKELSEN, T. L. *et al.* Caseinomacropeptide Self-Association is Dependent on Whether the Peptide is Free or Restricted in κ -Casein. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.12, p.4228–4238, 2005.
- OANCEA, S. Identification of glycomacropeptide as indicator of milk and dairy drinks adulteration with whey by immunochromatographic assay. **Romanian Biotechnology Letters**, v.14, n.1, p. 4146-4151, 2009.
- PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. Jaboticabal, Funep - UNESP. 287p. 2001.
- PRATA, L.F. **Distribuição de GMP* livre, em leites crus e pasteurizados, na definição da detecção de fraudes por adição de soro (*Glicomacropéptido)**. Tese de Livre-docência apresentada à FCAVJ / Unesp. Jaboticabal, SP. 105p. 2002.
- PRATA, L. F. Determinação de (Glicomacropéptido) no leite por meio da quantificação do ácido siálico – Esclarecimentos para adoção e implantação do método. **Revista Indústria de Laticínios**, v.16, n.81, p.75-80, 2009.
- SAEMAN, A. I.; VERDI, R. J.; GALTON, D. M.; BARBANO, D. M. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. **Journal of Dairy**

Science, v.71, n.2, p.505-512, 1988.

SHAMMET, K. M.; BROWN, R. J.; McMAHON, D. D. J. Proteolytic Activity of Some Milk-Clotting Enzymes on K-Casein. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.6, p.1373-1379, 1992.

SHAMMET, K. M.; BROWN, R. J.; McMAHON, D. D. J. Proteolytic Activity of Proteinases on Macropeptide Isolated from +Casein. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 6, p.1384-1388, 1992.

WALSTRA. P. On the Stability of Casein Micelles. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.8, p. 1975-1979, 1990.

WONG, N. P.; JENNESS, R.; KEENEY, M., *et al.* **Fundamentals of Dairy Chemistry** (3rd Edition). Springer - Verlag 1999 , 779p.