

CLÁUDIA APARECIDA DE OLIVEIRA E SILVA

**MODIFICAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA
DETECÇÃO, COM ALTA SENSIBILIDADE, DA FOSFATASE ALCALINA
RESIDUAL EM MANTEIGA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586m
2006

Silva, Cláudia Aparecida de Oliveira e, 1981-
Modificação do método rápido de Scharer para detecção,
com alta sensibilidade, da fosfatase alcalina residual em
manteiga / Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva.
– Viçosa : UFV, 2006.
xvii, 74f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Sebastião Cesar Cardoso Brandão.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos - Análise. 2. Manteiga. 3. Enzimas - Aplicações
industriais. 4. Fluorimetria. 5. Alimentos - Adulteração e
inspeção. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 664.07

CLÁUDIA APARECIDA DE OLIVEIRA E SILVA

**MODIFICAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER PARA
DETECÇÃO, COM ALTA SENSIBILIDADE, DA FOSFATASE ALCALINA
RESIDUAL EM MANTEIGA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de novembro de 2006.

Antônio Fernandes de Carvalho
(Co-Orientador)

Juraci Alves de Oliveira
(Co-Orientador)

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Edimar Aparecida Filomeno Fontes

Sebastião Cesar Cardoso Brandão
(Orientador)

A IMPORTÂNCIA DE CADA UM

Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho...
Porque cada pessoa é única para nós,
e nenhuma substitui a outra...
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho,
mas não vai só...
Leva um pouco de nós mesmos,
e nos deixa um pouco de si mesmo...
Há os que levam muito,
mas não há os que não levam nada...
Há os que deixam muito,
mas não há os que não deixam nada...
Esta é a mais bela realidade da vida.
A prova incontestável
da importância de cada um,
é que ninguém se aproxima
do outro por acaso.

(Antoine de Saint-Exupéry)

A todos aqueles que fizeram e fazem parte da minha vida. Que compartilham comigo seus sonhos, suas experiências, sua história. Que me ensinam, através da convivência, como me tornar **mestre** na arte de ser feliz...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida, pela perfeição de sua obra e pela oportunidade de recomeçar a cada dia com a absoluta certeza de que nunca estaremos sós.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação imensuráveis. Pela confiança, respeito, pelo apoio constante e principalmente pelo exemplo de vida e integridade.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e todos os seus funcionários.

À CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao professor Brandão, pela dedicação e pelo sublime exemplo profissional, pela orientação, pela confiança e por todas as oportunidades de aprendizado e trabalho ao longo de minha vida acadêmica.

Aos professores e co-orientadores Antônio e Juraci pelas sugestões, apoio, disponibilidade e interesse demonstrado.

À professora Edimar e à pesquisadora da EPAMIG Cláudia Lúcia, pela atenção e simpatia, disponibilidade e contribuições.

Aos estagiários: Aline, Heliane, Eduardo, Ramon e Marcos Paulo, pela imensa ajuda, imprescindível na realização deste trabalho.

Aos meus queridos e amados irmãos, pela amizade, carinho e convivência.

Às minhas “amigas-irmãs”: Veridiana, Janaína, Maike e Fabiana, por tudo que representam para mim, pelos sonhos e ideais compartilhados, pelos momentos felizes e também pelos momentos difíceis, que sempre significaram aprendizado e nos tornaram melhores.

Aos queridos amigos do Camilo Chaves, por sempre me fazerem lembrar que “só se vê bem com o coração, pois o essencial é invisível aos olhos”.

Aos amigos do laboratório de Análise de Alimentos: Adriana, Carmen, Lílian, Ana Cláudia e Tiago, pela amizade e alegria dos momentos compartilhados.

A todos os meus amigos, de perto e de longe, de curta e de longa data, pela companhia, pelas palavras de ânimo e apoio, pelo afeto e pela alegria constante.

Vocês serão sempre essenciais, únicos e especiais.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram,

Meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Cláudia Aparecida de Oliveira e Silva, filha de Maria das Dores da Silva e João de Oliveira e Silva, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 04 de outubro de 1981.

Completo o ensino médio profissionalizante em Técnica em Química pela Fundação Municipal de Ensino Profissionalizante/Escola Técnica de Sete Lagoas (FUMEP/ETSL) em 1999.

Em março de 2000, iniciou o curso superior em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2004. Em agosto do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos desta mesma instituição, submetendo-se a defesa de tese de mestrado em novembro de 2006.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT.....	XVI
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
ARTIGO 1: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM CREME CRU PADRONIZADO, NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO, UTILIZANDO O MÉTODO FLUORIMÉTRICO.....	6
RESUMO	6
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Obtenção e padronização do creme cru	7
2.2. Determinação da atividade da ALP no creme cru padronizado	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
4. CONCLUSÃO	11
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM MANTEIGAS COMERCIAIS PELO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, E PELO MÉTODO FLUORIMÉTRICO.....	14
RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Amostras	16
2.2. Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas comerciais	17
2.2.1. Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico	18
2.2.1.1. Análise visual	19
2.2.1.2. Análise espectrofotométrica	19
2.2.2. Avaliação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico.....	19

2.2.3. Teste de reativação	20
2.2.4. Interpretação final dos resultados	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4. CONCLUSÃO	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM MANTEIGA.....	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Padronização do creme cru, pasteurização e maturação	29
2.2. Fabricação das manteigas em escala laboratorial	29
2.3. Determinação da atividade da ALP no creme cru padronizado	30
2.4. Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas fabricadas	30
2.4.1. Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico	31
2.4.1.1. Análise visual	32
2.4.1.2. Análise espectrofotométrica	32
2.4.2. Avaliação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1. Variação da atividade da ALP no creme cru padronizado	33
3.2. Resultados da atividade residual da ALP nas manteigas pelos método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico e pelo método fluorimétrico.....	34
4. CONCLUSÃO	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ARTIGO 4: MODIFICAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER E AUMENTO DE SUA SENSIBILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM MANTEIGA	42
RESUMO	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44

2.1. Padronização do creme cru, pasteurização e maturação	44
2.2. Fabricação das manteigas em escala laboratorial	44
2.3. Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas fabricadas.....	45
2.3.1. Determinação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico	45
2.3.2. Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico	46
2.3.3. Modificação do método rápido de Scharer: “Método da Fase Aquosa”	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. CONCLUSÃO	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CONCLUSÕES GERAIS	56
ANEXO A.....	57
ANEXO B.....	59
ANEXO C.....	62
ANEXO D.....	64
ANEXO E.....	67
ANEXO F.....	69
ANEXO G	71
ANEXO H.....	72
ANEXO I	73
ANEXO J	74

LISTA DE QUADROS

ARTIGO 1: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM CREME CRU PADRONIZADO, NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO, UTILIZANDO O MÉTODO FLUORIMÉTRICO

Quadro 1 – Atividade média da ALP (mU/L), desvio padrão e coeficientes de variação encontrados para cada estação do ano.9

ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM MANTEIGAS COMERCIAIS PELO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, E PELO MÉTODO FLUORIMÉTRICO

Quadro 1 – Descrição dos tubos a serem analisados no teste de reativação.21

Quadro 2 – Resultado final da atividade da ALP nas amostras comerciais positivas após o teste de reativação utilizando o método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico (μg de fenol/g de amostra) e o método fluorimétrico (mU/Kg de amostra).22

Quadro 3 – Resultados obtidos para as amostras de manteigas comerciais utilizando o método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico e fluorimétrico.24

ARTIGO 3: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM MANTEIGA

Quadro 1 - Atividade da ALP determinada pelo método fluorimétrico no creme cru padronizado utilizado para fabricação das manteigas nas 10 repetições.33

Quadro 2 – Comparação dos resultados obtidos pelo método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico, e fluorimétrico nas 10 repetições realizadas.35

ARTIGO 4: MODIFICAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER E AUMENTO DE SUA SENSIBILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM MANTEIGA

Quadro 1 – Análise da atividade residual da ALP pelo método fluorimétrico em manteiga (adicionada de 0,1% v/v de creme cru) e em suas fases aquosa e oleosa.	49
Quadro 2 – Resultados obtidos para as amostras com atividade próximas a 350,0 mU/Kg nas 6 repetições realizadas para o desenvolvimento do “método da fase aquosa”.....	49
Quadro 3 – Resultados das análises das manteigas e respectivas fases aquosas nas 6 repetições realizadas, utilizando o método rápido de Scharer visual convencional e o método modificado desenvolvido.....	50
Quadro 4 – Resultados das análises das manteigas e respectivas fases aquosas nas 6 repetições realizadas, utilizando o método rápido de Scharer espectrofotométrico convencional e o método modificado desenvolvido.....	51

ANEXO A

Quadro 1A – Atividade da ALP (mU/L) nas amostras de creme cru padronizado coletadas no verão.....	57
Quadro 2A – Atividade da ALP (mU/L) nas amostras de creme cru padronizado coletadas no outono.....	58
Quadro 3A – Atividade da ALP (mU/L) nas amostras de creme cru padronizado coletadas no inverno.....	58

ANEXO B

Quadro 1B – Resposta obtida na execução do programa para leitura dos dados relativos à atividade da ALP no creme cru padronizado e realização da análise de	
---	--

variância (ANOVA), ao nível de 5,0% de probabilidade, teste de médias (Duncan) e cálculo dos desvios padrões.59

ANEXO D

Quadro 1D - Construção da curva de calibração.....64

ANEXO E

Quadro 1E – Curvas de calibração utilizadas para a avaliação das manteigas comerciais na primeira análise e na segunda análise (após o teste de reativação).
.....67

Quadro 2E – Curvas de calibração utilizadas nas repetições realizadas para avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico.67

Quadro 3E – Curvas de calibração utilizadas na etapa de desenvolvimento do novo método (“método da fase aquosa”).68

ANEXO F

Quadro 1F – Resultados das análises das manteigas fabricadas com diferentes quantidades de creme cru (v/v) adicionadas utilizando o método rápido de Scharer visual, comparando as amostras tanto com o Controle Negativo (CN) como com o tubo 1,0 µg de fenol equivalente/mL da curva de calibração.69

Quadro 2F – Resultados expressos em microgramas de fenol/g de amostra para as manteigas fabricadas com diferentes quantidades de creme cru (v/v) adicionadas e analisadas pelo método rápido de Scharer espectrofotométrico. ...70

ANEXO G

Quadro 1G – Resultados expressos em microgramas de fenol/g de amostra de manteiga para as 6 repetições realizadas pelo método rápido de Scharer espectrofotométrico convencional.....71

Quadro 2G – Resultados expressos em microgramas de fenol/mL de fase aquosa para as 6 repetições realizadas pelo novo método desenvolvido (“método da fase aquosa”).....71

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM CREME CRU PADRONIZADO, NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO, UTILIZANDO O MÉTODO FLUORIMÉTRICO

Figura 1 – Distribuição da atividade da ALP no creme cru padronizado no verão (amostras de 1 a 6), outono (amostras de 7 a 13) e no inverno (amostras de 14 a 20).....10

ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM MANTEIGAS COMERCIAIS PELO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, E PELO MÉTODO FLUORIMÉTRICO

Figura 1 – Seqüência das análises da atividade de ALP para as manteigas comerciais.....17

ANEXO D

Figura 1D - Curva de Calibração contendo 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de fenol equivalente/mL.....66

ANEXO H

Figura 1H – Confirmação do resultado positivo para ALP residual em uma das amostras da Marca E.....72

Figura 2H – Ocorrência de reativação da ALP em uma das amostras da Marca E
.....72

ANEXO I

Figura 1I – Tubos do controle negativo, manteiga pasteurizada e manteigas fabricadas com 0,010%; 0,015%, 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v) de creme cru adicionado ao creme pasteurizado.73

Figura 2I – Tubos obtidos em uma outra repetição da avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer.....73

ANEXO J

Figura 1J – Tubos correspondentes à análise das fases aquosas do controle negativo, da manteiga pasteurizada, da manteiga com atividade próxima a 350,0 mU/Kg e da manteiga com alta atividade, respectivamente.74

Figura 2J – Tubos referentes à análise da manteiga pasteurizada e da manteiga com atividade próxima a 350,0 mU/Kg, utilizando o método rápido de Scharer convencional e utilizando o novo método desenvolvido, respectivamente.74

RESUMO

SILVA, Cláudia Aparecida de Oliveira e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2006. **Modificação do método rápido de Scharer para detecção, com alta sensibilidade, da fosfatase alcalina residual em manteiga.** Orientador: Sebastião Cesar Cardoso Brandão. Co-Orientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Juraci Alves de Oliveira.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima naturalmente presente no leite. Suas concentrações variam de acordo com a raça do animal, alimentação, período de lactação, produtividade e ao longo das estações do ano. A ALP é inativada pelas temperaturas de pasteurização, assim, a avaliação da atividade residual desta enzima é utilizada na indústria de laticínios para determinar a eficiência do tratamento térmico aplicado aos produtos lácteos. Todavia, trabalhos sobre a atividade desta enzima em manteiga são escassos, principalmente no Brasil, onde esta análise não é um procedimento obrigatório na avaliação da qualidade de manteiga, como ocorre nos Estados Unidos e em países da Europa. De acordo com a Food and Drug Administration (FDA), o limite máximo permitido de atividade residual da ALP em leite e produtos lácteos pasteurizados é de 350,0 mU/Kg de produto, pelo método fluorimétrico. Neste trabalho, os valores médios encontrados para a atividade desta enzima no creme cru padronizado (entre 40,0 e 41,0% de gordura) durante o verão, o outono e o inverno, pelo método fluorimétrico, foram de $17.264.214 \pm 2.554.645$, $17.719.500 \pm 5.476.910$ e $14.196.714 \pm 1.375.055$ mU/L, respectivamente. Foram analisadas amostras de manteigas comerciais quanto às quantidades residuais da ALP, avaliou-se a sensibilidade e o limite de detecção do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, em comparação com o método fluorimétrico e modificou-se o método rápido de Scharer, obtendo-se uma nova metodologia, de alta sensibilidade e de custo mais acessível para determinação da atividade residual da ALP em manteiga. Dentre as vinte amostras de manteigas comerciais analisadas, quatro (20%) apresentaram resultado positivo para atividade residual da ALP, sendo duas da marca A e as outras duas das marcas B e E. Duas amostras da marca E apresentaram reativação da enzima, não confirmando assim o resultado positivo inicial.

Para a avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer, manteigas foram fabricadas a partir de creme pasteurizado adicionado de quantidades de 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v) de creme cru. Por meio do método visual foi possível detectar apenas concentrações a partir de 0,050% de creme cru, não apresentando sensibilidade condizente com o método fluorimétrico. O método espectrofotométrico foi mais sensível, sendo capaz de detectar a concentração de creme cru correspondente ao limite estabelecido, mas que não correspondia à concentração de creme cru e à quantidade de fenol/g de amostra preconizadas por alguns autores como indicativos de pasteurização ineficiente (0,1% de contaminação com creme cru e 1,0 µg de fenol/g de amostra, respectivamente). O desenvolvimento da nova metodologia baseou-se na realização de modificações no método rápido de Scharer. Utilizou-se alíquotas de 0,5 mL de fase aquosa para a análise da atividade da ALP, em substituição à alíquota de 0,5 g de manteiga, utilizada no método convencional. A fase aquosa foi obtida a partir da fusão da manteiga a 45 °C e subsequente centrifugação a 1200 x g por 10 minutos. Nas amostras avaliadas, foi possível distinguir visualmente as manteigas com atividade igual ou próxima a 350,0 mU/Kg (coloração esverdeada) das manteigas pasteurizadas (coloração amarela) e dos controles negativo e de interferentes. Na análise espectrofotométrica, obteve-se um valor médio para a atividade residual da ALP de 0,115 µg de fenol por amostra (0,5 g de manteiga) de manteiga, pelo método rápido de Scharer convencional e 0,385 µg de fenol por amostra (0,5 mL de fase aquosa), pelo novo método desenvolvido. Estes valores sugerem que a sensibilidade do método convencional foi aumentada em, aproximadamente, 3,3 vezes. O método modificado apresentou limite de detecção da atividade da ALP de acordo com os limites estabelecidos pela FDA, e constitui uma alternativa de custo mais acessível para a determinação de baixas concentrações residuais desta enzima em manteiga.

ABSTRACT

SILVA, Cláudia Aparecida de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2006. **Modification of the fast method of Scharer for detection, with high sensitivity, of the residual alkaline phosphatase in butter.** Advisor: Sebastião César Cardoso Brandão. Co-Advisors: Antônio Fernandes de Carvalho and Juraci Alves de Oliveira.

The alkaline phosphatase (ALP) is enzyme naturally present in the milk. It's concentration depends the animal breed, feed, period of lactation, yield, season the year. In this work, mediums values for the activity this enzyme in the padronized raw cream (40,0% to 41,0% of fat) during the summer, the fall and the winter using the fluorimetric was $17.264.214 \pm 2.554.645$, $17.719.500 \pm 5.476.910$ and $14.196.714 \pm 1.375.055$ mU/L, respectively. The analyses of ALP is used in the dairy industry to determine efficient the pasteurization. However, scientific works about this enzyme in cream are scarce, mainly in Brazil, where his analyses isn't an obliged procedure for assessment the quality butter, how happen in another countries. According to Food and Drug Administration (FDA), the maximum residual of ALP in pasteurized milk and dairy products by the fluorimetric method must be below 350 mU/Kg. There have been analyzed residual ALP, the sensitivity and the limit of detection of commercial butter samples, by visual Scharer and spectrophotometric method to compared with fluorimetric method and new method with high sensitivity was developed and its cost is smaller for determination residual ALP butter. Of the 20 samples commercials butter four (20%) presented positive resulted residual ALP, two was brand A and another two is brand B and E. Two samples of brand E presented enzyme's reactivation, didn't have confirm the initial positive resulted. In the assessment of sensitivity method Scharer's rapid visual, butters were obtained by addition in different proportions: 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% and 0,100% (v/v) of raw cream. The visual method was able to detect only concentrations by addition 0,050% raw cream, doesn't presented sensitivity in accordance with method fluorimetric. The spectrophotometric method was more sensitive, because detect concentration of raw cream corresponding detection limit, but it doesn't corresponded the concentration of raw cream and magnitude phenol/g of sample recognized by several authors that indicated incorrectly pasteurized using this method (0,1% of

contamination with raw cream and 1,0 µg phenol/g by sample, respectively). The development new method consists in modification in the fast method of Scharer. There have been used 0,5 ml of water phase for analyses ALP, in replacement to the aliquot 0,5 g butter, used in the conventional method. The water phase was obtained by butter fusion 45 °C and followed centrifugation 1200 x g for 10 minutes. In the six repetitions, was possible distinguish visually butter with equal activity or near a 350 mU/Kg ("limits butters") by pasteurized butters and controls negative and interferents. In the analyses spectrophotometric, it got a value medium residual ALP 0, 115 µg phenol for sample (0,5g of butter), using the conventional method Scharer's rapid and 0,385 µg de phenol for sample (0,5 mL water phase), using the new method development. These values suggest sensitivity conventional method was increase approximately 3,3 times. The modified method presented limit detection of ALP in accordance with establishment FDA so it is an alternative with lower costs for detection the lower residuals levels this enzyme in butter.

INTRODUÇÃO GERAL

No leite bovino normal são reportadas aproximadamente 70 enzimas. Algumas delas são tecnologicamente significantes por estarem envolvidas em processos de deterioração (lipases e proteases), por exercerem atividade antimicrobiana (lisozima, lactoperoxidase) ou por serem utilizadas como indicativo da eficiência do tratamento térmico, como é o caso da fosfatase alcalina (Fox e Kelly, 2006).

Pasteurizar o leite consiste em destruir, pelo emprego conveniente do calor, a quase totalidade da flora banal e toda a flora patogênica, quando esta existir, modificando, contudo, o menos possível a estrutura física e o equilíbrio químico do leite, assim como sua constituição e os seus elementos bioquímicos (Walstra et al., 1999). O binômio tempo e temperatura da pasteurização em produtos lácteos, visa a destruição do microrganismo patogênico mais termorresistente conhecido, que é a *Coxiella burnetti*.

A determinação da atividade residual da fosfatase alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) é utilizada na indústria de laticínios para comprovar a eficiência do processo de pasteurização. Sua resistência térmica é ligeiramente superior à das formas não esporuladas dos microrganismos patogênicos mais resistentes que podem estar presentes no leite (Karmas et al., 1990). Assim, o tratamento aplicado comercialmente para a pasteurização do leite ou do creme de leite, além de inativar os microrganismos patogênicos, diminui a atividade da ALP a concentrações residuais.

Análises laboratoriais para determinar a atividade residual da ALP são baseadas na exposição de substratos específicos à enzima, com subsequente detecção do produto da reação (cor, fluorescência ou luz). A enzima hidrolisa ésteres monofosfatados, em temperatura e pH adequados, o que leva à liberação dos produtos da reação, que podem ser quantificados. A quantidade de enzima presente nos produtos lácteos é proporcional à quantidade dos produtos formados (Murthy et al., 1992 e Fox e Kelly, 2006).

O primeiro teste enzimático para determinar a eficiência da pasteurização foi desenvolvido, em 1933, por Kay e Graham (Kay & Graham, 1935) e,

atualmente, muitos outros métodos já foram elaborados (Rocco, 1990; Sharma et al., 2003; Castro, 2005; Chen et al., 2005; Serra et al., 2005). A evolução das metodologias seguiu a busca de maior sensibilidade e de maior rapidez na determinação das concentrações residuais da enzima (Angelino et al., 1999).

O método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, é um teste colorimétrico clássico para determinação da atividade da ALP (Cornell, 1998). A grande desvantagem dos métodos colorimétricos é a baixa sensibilidade. O limite de detecção varia entre 0,1% a 0,5% (v/v) de leite cru adicionado (Rocco, 1990 e Claves et al., 2002).

Entretanto, o método fluorimétrico (Fluorophos®) apresenta como principais vantagens rapidez na realização, confiabilidade dos resultados, possibilidade de quantificação e registros impressos, além dos baixos limites de detecção, que podem chegar até 0,006% de leite cru adicionado ao leite pasteurizado (Cornell, 1998). Todavia, seu emprego é dificultado pelo alto custo dos reagentes e dos equipamentos.

Atualmente, a FDA aprova como métodos oficiais para a quantificação da ALP o método fluorimétrico Fluorophos®, o método Charm Chemiluminescent ALP, ou equivalentes, que tenham a sensibilidade de detectar o limite estabelecido de 350,0 mU de enzima/L de produto fluido ou Kg de produto sólido (FDA, 2003).

O método oficial adotado para leite no Brasil é uma adaptação do método rápido de Scharer Visual (Brasil, 2003). O limite de detecção para este método é atualmente considerado insatisfatório (Castro, 2005), e a metodologia oficial brasileira é aplicada somente para análise de leite fluido pasteurizado, não contemplando derivados lácteos.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade define como manteiga “o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados” (BRASIL, 1996). Porém, a análise da atividade residual da ALP no creme pasteurizado ou na manteiga não é um procedimento estabelecido como obrigatório para liberação do produto para comercialização.

Informações sobre a atividade residual da ALP em manteiga, bem como avaliações da sensibilidade e dos limites de detecção para este produto são

escassas. Este fato ocorre principalmente no Brasil, onde a análise da ALP não é um procedimento analítico obrigatório pela legislação vigente para verificação da eficiência da pasteurização do creme usado na fabricação da manteiga (BRASIL, 1996). Em condições insuficientes de pasteurização, a enzima é reduzida a concentrações acima das consideradas apropriadas, o que demonstra a ineficiência da pasteurização ou uma pós-contaminação com matéria-prima crua, e neste caso, o produto pode veicular microrganismos patogênicos e colocar em risco a saúde do consumidor.

O presente trabalho teve como principal objetivo modificar o método rápido de Scharer e obter uma metodologia mais sensível para determinação da atividade residual da ALP em manteiga. Trabalhou-se no intuito de obter-se uma metodologia que fosse adequada ao limite proposto pela FDA, ou seja, que apresentasse sensibilidade semelhante à do método fluorimétrico, mas que tivesse menor custo, e desta forma fosse mais acessível às indústrias de laticínios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELINO, P.D., CHRISTEN, G.L., PENFIELD, M.P., BEATTIE, S. Residual alkaline phosphatase activity in pasteurized milk heated at various temperatures – measurement with the Fluorophos and Scharer rapid phosphatase tests. **Journal of Food Protection**. v. 62. nº 1. p. 81-85, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. DOU 83 maio/2003.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga**. 1996.

CASTRO, P.R.S. Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. 51 p. 2005.

CHEN, CHAO-CHENG, TAI, YU-CHANG, SHEN, SZU-CHUAN, TU, YANN-YING, WU, MING-CHANG, CHANG, HUNG-MIN. Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using immunoglobulin in yolk (IgY) specific against bovine milk alkaline phosphatase. **Food Chemistry**. p. 1-8, 2005.

CLAEYS, W.L., LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. **Trends in Food Science & Technology**. v. 13. p. 293-311, 2002.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. **Dairy Science Facts**. Department of Food Sciences. Stocking Hall, Ithaca, NY 14853. 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - CFSAN/Office of Compliance. **Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance**. Public health service publication (2003 Revision). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Washington. DC. 340 p. 2003.

FOX, P.F., KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – part 2. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 517-532, 2006.

KAY, H. D.; GRAHAM, W. R. The Phosphatase test for pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**. v. 6. p. 191-203, 1935.

KARMAS, R., KLEYN, D.H. Determination and interpretation of alkaline phosphatase activity in experimental and commercial butters. **Journal of Dairy Science**. v. 73. nº 3. p. 584-589, 1990.

MURTHY, G.K., KLEYN, D.H., RICHARDSON, T., ROCCO, R.M. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association.** 16th Edition. Edited by Robert T. Marshall. p. 412-430, NW Washington, DC. 1992.

ROCCO, R.M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. **Journal of Food Protection.** v. 53. n° 7. p. 588-591, 1990.

SERRA, B., MORALES, M.D., REVIEJO, A.J., HALL, E.H., PINGARRÓN, J.M. Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. **Analytical Biochemistry.** v. 336. p. 289-294, 2005.

SHARMA, S. K., SEHGAL, N., KUMAR, A., Dry-reagent strips for testing milk pasteurization. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.** v 36. p. 567-571, 2003.

WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., BOEKEL, M.A.J.S. Chapter 2: Milk Components in **Dairy Technology** – Principles of milk properties and processes. New York – USA. p. 91-98, 1999.

ARTIGO 1

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM CREME CRU PADRONIZADO, NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO, UTILIZANDO O MÉTODO FLUORIMÉTRICO

RESUMO

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima naturalmente presente no leite. Suas concentrações variam de acordo com a raça do animal, alimentação, período de lactação, produtividade e ao longo das estações do ano. O estudo da variação da atividade da ALP é importante porque, mesmo que ocorram variações, o tratamento térmico a que o creme cru é submetido deve garantir que a atividade residual da enzima esteja dentro dos limites legais estabelecidos. Neste trabalho foi realizada a determinação quantitativa da atividade desta enzima no creme cru padronizado entre 40,0 e 41,0% de gordura, durante o verão, o outono e o inverno, pelo método fluorimétrico. Os valores médios encontrados foram de $17.264.214 \pm 2.554.645$ mU/L, $17.719.500 \pm 5.476.910$ mU/L e $14.196.714 \pm 1.375.055$ mU/L no verão, outono e inverno, respectivamente. Verificou-se, pela análise de variância, diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias da atividade da ALP nas diferentes estações. A atividade média no inverno diferiu das médias observadas no outono e no verão, sendo que estas últimas não diferiram entre si, pelo Teste de Duncan ($p < 0,05$). Uma maior variação foi encontrada no outono, cujos valores mínimo e máximo foram de 9.872.000 e 28.733.500 mU/L, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

A Fosfatase Alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) é uma enzima amplamente distribuída na natureza e natural do leite cru (Rocco, 2004).

A quantidade da ALP no leite varia de acordo com a raça do animal, a alimentação, o período de lactação, a produtividade e ao longo das estações do

ano. Quantidades muito altas são encontradas no colostro e são, em geral, constantes nas 25 semanas após o parto. Há uma relação inversa entre a atividade da ALP no leite cru e o rendimento da produção pelo animal (Fox, 1992).

Em relação às estações do ano, a atividade aumenta durante o verão, permanece alta no outono e diminui novamente no inverno. Cerca de 30% a 40% da atividade da ALP encontra-se adsorvida na membrana dos glóbulos de gordura. Conseqüentemente, há uma menor atividade da ALP no leite cru desnatado do que no leite cru integral (Claeys et al., 2002).

Análises laboratoriais para determinação da atividade da ALP são baseadas no princípio de que a enzima hidroliza ésteres monofosfatados a temperatura e pH determinados, e leva a liberação de compostos que podem ser detectados pelo desenvolvimento de coloração, fluorescência ou luz. A quantidade de enzima presente nos produtos lácteos é proporcional à intensidade dos produtos formados (Murthy et al., 1992 e Fox e Kelly, 2006).

No ensaio fluorimétrico, a ALP presente na amostra hidrolisa um substrato não fluorescente (fluorophos) e leva a liberação de um produto altamente fluorescente (fluoroyellow). Tem como vantagens a rapidez, sensibilidade e facilidade de realização (Rocco, 1990).

O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade da ALP no creme cru padronizado, a ser usado na fabricação de manteiga, durante três estações do ano (verão, outono e inverno), pelo método fluorimétrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e padronização do creme cru

Creme cru integral foi obtido no Laticínios Escola da Universidade Federal de Viçosa entre os meses de dezembro de 2005 e setembro de 2006.

Após a análise do teor de gordura pelo método butirométrico de Gerber, foi realizada a padronização com água destilada ou leite desnatado para 40,0% a 41,0% de gordura. Em seguida o creme era submetido à análise da ALP.

Foram analisadas vinte amostras, sendo seis no verão, sete no outono e sete no inverno.

2.2. Determinação da atividade da ALP no creme cru padronizado

A atividade da ALP no creme cru padronizado foi realizada em duplicata, pelo método fluorimétrico, segundo a metodologia descrita por Rocco, no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (2004).

Em função da alta atividade da enzima no creme cru, tornou-se necessário realizar uma diluição 1:1000 (v/v) do creme antes de submetê-lo à análise fluorimétrica. Um mililitro da amostra de creme cru foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de um litro, contendo aproximadamente 500,0 mL de água destilada à temperatura ambiente. O conteúdo do balão foi agitado até total dispersão da amostra e completou-se o volume com água.

Dois mililitros da solução de substrato Fluorophos® foram adicionados em cubetas próprias e estabilizadas em bloco de aquecimento, a 38 °C, por no mínimo, 20 minutos. Alíquota de 75,0 µL da amostra diluída foi retirada com pipetador próprio e adicionada aos 2,0 mL de substrato. A cubeta contendo a amostra e o substrato foi tampada com filme plástico tipo PVC, agitada rapidamente e inserida no porta cubeta do equipamento.

Após o primeiro minuto, necessário para que ocorresse a estabilização da temperatura, a taxa de fluorescência emitida pela amostra por minuto (F/min) foi medida, automaticamente, durante dois minutos. Uma unidade da enzima ALP corresponde à quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1,0 µmol de substrato Fluorophos®, por minuto, por litro de amostra. Os resultados são expressos em miliunidades da enzima por litro de creme (mU/L), em função das baixas concentrações da enzima nos produtos finais. O resultado era exibido na tela do aparelho e impresso automaticamente. O valor obtido foi multiplicado por 1000 (fator de diluição da amostra).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, teste de médias e cálculo dos desvios padrões, com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS, Institute Inc., North Carolina, USA, 1999) licenciado para a Universidade Federal de Viçosa em 2006.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os maiores valores de atividade da ALP foram encontrados no verão e no outono, sendo pequena a diferença entre as médias destas duas estações. Já no inverno houve uma redução da atividade da enzima (Quadro 1).

Verificou-se, por meio da análise de variância, em nível de 5,0% de probabilidade, que houve diferença significativa entre as médias da atividade da ALP nas diferentes estações estudadas. A atividade média no inverno diferiu das médias observadas no outono e no verão, pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Já as médias do verão e outono não diferiram entre si.

Quadro 1 – Atividade média da ALP (mU/L), desvio padrão e coeficientes de variação encontrados para cada estação do ano.

Estação	Número de amostras	Atividade média (mU/L) *		Coeficiente de variação (CV %)
Verão	6	17.264.214 \pm 2.554.645	a	14,80
Outono	7	17.719.500 \pm 5.476.910	a	30,91
Inverno	7	14.196.714 \pm 1.375.055	b	9,69
	20	16.393.476 \pm 3.578.340		21,83

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de 5,0% de probabilidade pelo teste de Duncan.

A maior variação na atividade da ALP foi encontrada durante o outono, cujos valores mínimo e máximo foram de 9.872.000 mU/L e 28.733.500 mU/L, respectivamente. Estes valores foram os extremos da atividade constatados durante esta estação e em comparação com as outras duas estações estudadas. No inverno ocorreu a menor variação da atividade da ALP, com um coeficiente de variação (CV) para os resultados deste período igual a 9,69% (Figura 1).

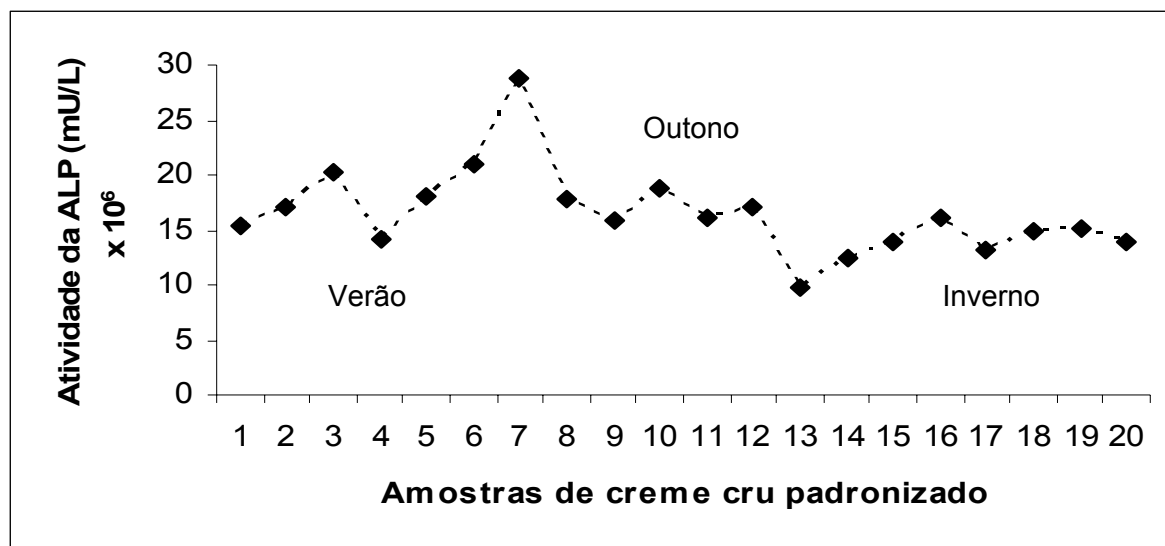


Figura 1 – Distribuição da atividade da ALP no creme cru padronizado no verão (amostras de 1 a 6), outono (amostras de 7 a 13) e no inverno (amostras de 14 a 20).

Os resultados constatados neste estudo condizem com os trabalhos de Claeys et al. (2002), onde os autores também constataram o aumento da atividade da ALP durante o verão e que esta atividade permanece alta no outono e reduz no inverno.

Os valores de atividade da ALP para o creme cru padronizado nas estações estudadas foram muito superiores aos encontrados por Castro (2005) em leite cru integral, onde observou-se, utilizando também o método fluorimétrico, um aumento natural da atividade no verão comparado à primavera, com valores que variaram entre 516.800 mU/L na primavera e 1.519.800 mU/L no verão.

Ao trabalharem com leite com 0,5%; 2,0% e 3,25% de gordura, Angelino et al. (1999) concluíram que a atividade residual da enzima era maior quanto maior fosse o teor de gordura, mas independente disto, o tratamento mínimo de 63 °C, por 30 minutos, estabelecido pela Food and Drugs Administration (FDA) para a pasteurização lenta do leite possibilitou a obtenção de valores para a atividade da ALP dentro dos limites preconizados.

O aumento da atividade enzimática constatada no creme comparado ao leite cru pode ser explicado pelo fato de que cerca de 30% a 40% da ALP encontra-se adsorvida na membrana dos glóbulos de gordura, apesar da enzima

não ser lipossolúvel (Painter, 1995). Logo, após a centrifugação do leite, grande parte da enzima, e conseqüentemente da atividade, é encontrada no creme.

Assim, há menor atividade da ALP no leite cru desnatado do que no leite cru integral e do que no creme. Este fato já foi comprovado por diversos autores (Hetrick e Tracy, 1948; Angelino et al., 1999 e Claeys et al., 2002).

Métodos colorimétricos associam o limite legal estabelecido com percentuais de concentração de leite cru adicionado ao leite pasteurizado. No método rápido de Scharer espectrofotométrico, por exemplo, é admitida a quantidade de até 1,0 µg de fenol/mL ou grama de produto lácteo, o que corresponde a 0,1% (v/v) de contaminação com leite cru adicionado ao leite pasteurizado (Murthy et al., 1992). Porém, como a atividade da enzima varia, e em produtos gordurosos ela é naturalmente superior que no leite, esta relação pode não ser um bom indicador para se determinar a eficiência da pasteurização.

A FDA estabelece, para o creme de leite e outros produtos que tenham percentual de gordura igual ou superior a 10,0% os tratamentos térmicos de 66 °C, por 30 minutos, 75 °C, por 15 segundos ou 92 °C, por 1 segundo, pelos processos LTLT (“low temperature long time”) e HTST (“high temperature short time”), respectivamente (FDA, 2003). Estes tratamentos são suficientes para reduzir a atividade da ALP até as quantidades residuais permitidas, que é igual ou menor que 350,0 mU/L, pelo método fluorimétrico.

4. CONCLUSÃO

O estudo da variação da atividade da ALP é importante pelo fato de que, quanto maior for a atividade no leite ou no creme cru, maior será a atividade residual após o tratamento térmico, para um mesmo binômio tempo/temperatura. Logo, mesmo com a ocorrência da variação, o tratamento térmico a que estes produtos são submetidos, deve garantir que a atividade residual esteja de acordo com os limites legais estabelecidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELINO, P.D., CHRISTEN, G.L., PENFIELD, M.P., BEATTIE, S. Residual alkaline phosphatase activity in pasteurized milk heated at various temperatures – measurement with the Fluorophos and Scharer rapid phosphatase tests. **Journal of Food Protection**. v. 62. nº 1. p. 81-85, 1999.

CASTRO, P.R.S. Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa. 51 p. 2005.

CLAEYS, W.L., LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. **Trends in Food Science & Technology**. v. 13. p. 293-311, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - CFSAN/Office of Compliance. Grade “A” **Pasteurized Milk Ordinance**. Public health service publication (2003 Revision). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Washington. DC. 340 p. 2003.

FOX, P.F., KELLY, A.L. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – part 2. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 517-532, 2006.

FOX, P.F. Chapter IV: Phosphatases in Milk. In: **Advanced dairy chemistry – Proteins**. Elsevier applied science. p. 322-325. London and New York, 1992.

HETRICK J.H., TRACY, P.H. Effect of high-temperature short-time heat treatments on some properties of milk. I. Inactivation of the phosphatase enzyme. **Journal of Dairy Science**. v. 31. p. 867-879, 1948.

MURTHY, G.K., KLEYN, D.H., RICHARDSON, T., ROCCO, R.M. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 16th Edition. Edited by Robert T. Marshall. p. 412-430, NW Washington, DC, 1992.

PAINTER, C.J. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time/temperature treatments. **Thesis (Master of Science)**. University of Wisconsin-Madison. 119 p. 1995.

ROCCO, R.M., FITTS, J. Chapter 14: Alkaline phosphatase methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 17th Edition. Edited by H. Michael Wehr and Joseph F. Frank. p. 341-362. NW Washington, DC. 2004.

ROCCO, R.M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. **Journal of Food Protection**. v. 53. n° 7. p. 588-591. 1990.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA EM MANTEIGAS COMERCIAIS PELO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, E PELO MÉTODO FLUORIMÉTRICO

RESUMO

A determinação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) é utilizada na indústria de laticínios para verificar a eficiência do processo de pasteurização. No Brasil esta análise não é um procedimento obrigatório na avaliação da qualidade de manteiga, como ocorre em outros países. Foram avaliadas vinte amostras de manteiga de cinco diferentes marcas comercializadas na cidade de Viçosa-MG. Utilizou-se o método colorimétrico rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, e método fluorimétrico. Realizou-se também o teste de reativação para confirmação dos resultados positivos. Quatro amostras (20%) apresentaram resultado positivo para atividade residual da ALP, sendo duas da marca A, uma da marca B e uma da marca E. Duas amostras da marca E apresentaram reativação da enzima, não confirmando assim o resultado positivo inicial. Foi possível distinguir claramente a ALP residual da reativada pelos três métodos utilizados. Os resultados encontrados reforçam a importância e a necessidade de se estabelecer, no Brasil, a análise da atividade da ALP como procedimento obrigatório para determinação da qualidade da manteiga.

1. INTRODUÇÃO

A análise da atividade da fosfatase alcalina (ALP) é utilizada na indústria de laticínios para determinar a eficiência do processo de pasteurização. A resistência térmica desta enzima é ligeiramente superior à das formas não esporuladas dos microrganismos patogênicos contaminantes do leite, que podem estar presentes (Karmas et al., 1990). O binômio tempo e temperatura da pasteurização em

produtos lácteos visa a destruição do microrganismo patogênico mais termorresistente conhecido, que é a *Coxiella burnetti*.

A Food and Drug Administration (FDA) estabelece para o creme de leite e para outros produtos que tenham percentual de gordura igual ou superior a 10,0%, os tratamentos térmicos mínimos de 66 °C, por 30 minutos, 75 °C, por 15 segundos ou 92 °C, por 1 segundo, pelos processos LTLT (“low temperature long time”) e HTST (“high temperature short time”), respectivamente (FDA, 2003).

Análises laboratoriais para determinar a atividade da ALP são baseadas na exposição de substratos específicos à enzima com subsequente detecção dos produtos de reação. O método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, é um teste colorimétrico clássico para determinação da ALP (Cornell, 1998). O substrato usado, sob ação da enzima, libera fenol. O fenol reage com 2,6-dicloroquinona 4-cloroimida (CQC) e forma o indofenol, de coloração azul. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à atividade da enzima. No método fluorimétrico o produto da reação é fluorescente, e a intensidade da fluorescência produzida também é proporcional à atividade enzimática.

A fosfatase alcalina pode apresentar a capacidade de reativação após os tratamentos HTST e UHT (“ultra high temperature”). Logo, resultados falsos positivos para atividade desta enzima podem ser atribuídos à reativação parcial da mesma, em determinadas condições de processamento, tempo e temperatura de estocagem (Fox, 1992).

A reativação pode ocorrer em manteigas obtidas a partir de creme submetido a condições de pasteurização com baixo tempo de retenção e mantidas em temperaturas altas durante a estocagem e comercialização. Assim, é necessária a diferenciação entre a fosfatase alcalina reativada e a residual, para então confirmar que houve uma pasteurização ineficiente do creme usado para fabricação das manteigas comerciais.

No Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade define como manteiga “o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme pasteurizado, derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados” (BRASIL, 1996). Porém, a análise da atividade residual da ALP no creme pasteurizado ou no produto acabado ainda não é um procedimento obrigatório

para liberação do produto para comercialização, como acontece nos Estados Unidos e em países da Europa.

Entre junho de 1998 e abril de 1999 um surto causado por *Listeria monocytogenes* sorotipo 3a, presente em manteiga, ocorreu na Finlândia. A empresa fabricante teve uma produção de 2,5 mil toneladas no ano de 1998, sendo que 28,0% desta produção foi exportada. A manteiga era fabricada a partir de creme pasteurizado, a 90 °C, por 30 segundos, em processo contínuo. A eficiência do processo de pasteurização era avaliada somente pelo registro da temperatura e pela análise da atividade da peroxidase no creme pasteurizado e no leite (Maijala et al., 2001).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a adequação de amostras de manteiga comerciais quanto aos padrões internacionais para a atividade residual da ALP e, conseqüentemente, a eficiência da pasteurização do creme usado para a fabricação destas manteigas. Teve também como objetivo demonstrar aos órgãos de fiscalização responsáveis a importância e a necessidade da implementação da análise da atividade da ALP em manteiga, para averiguação da qualidade deste produto no que tange à segurança alimentar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

As manteigas foram adquiridas em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Viçosa – MG, ao longo de um mês.

Realizou-se quatro aquisições em datas distintas. Em cada uma delas adquiriu-se amostras de cinco diferentes marcas, codificadas como A, B, C, D e E, seguidas do número da amostra: 1, 2, 3 ou 4. Todas as marcas eram fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Foram avaliadas vinte amostras, sendo quatro de cada marca.

As manteigas comerciais eram estocadas congeladas, imediatamente após a aquisição, e analisadas quanto a atividade da ALP entre 24 a 48 horas após a aquisição.

2.2. Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas comerciais

As manteigas comerciais foram analisadas quanto à atividade da ALP pelo método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, e pelo método fluorimétrico. As amostras que apresentaram resultados positivos foram submetidas ao teste de reativação e analisadas novamente. Apesar de, atualmente, a FDA admitir como oficial somente o método fluorimétrico (Fluorophos®) e o de quimiluminescência (Charm Test), para a análise da atividade da ALP em leite e derivados e estabelecer o limite de 350,0 mU/L ou Kg de produto, optou-se por utilizar também o método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, por ser, dentre os métodos colorimétricos, os mais amplamente difundidos e empregados.

Utilizou-se as metodologias descritas por Rocco, no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (2004). A seqüência das análises realizadas para as manteigas comerciais está ilustrada na Figura 1.

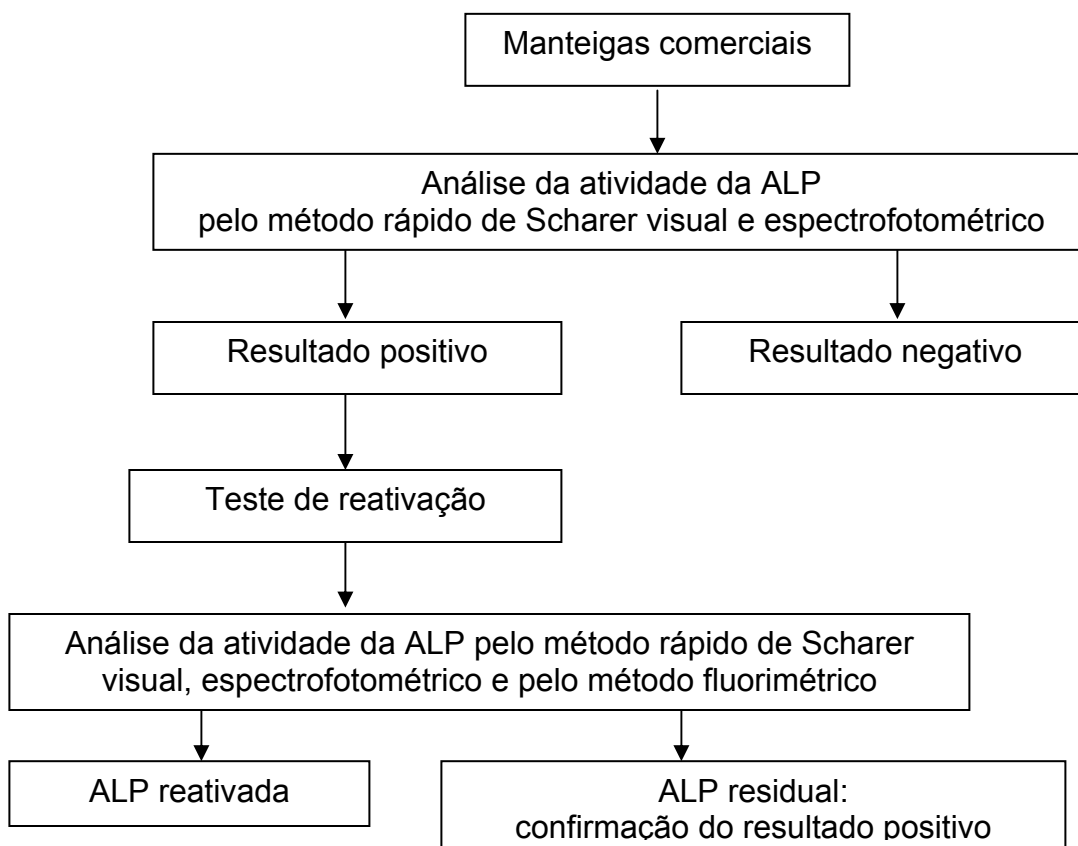


Figura 1 – Seqüência das análises da atividade de ALP para as manteigas comerciais.

2.2.1. Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico

Partindo-se das amostras congeladas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), pesou-se porções de 0,5 g (em triplicata) diretamente nos tubos de ensaio. Pesou-se também 0,5 g do controle negativo, representado por amostra de manteiga tratada a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 minuto. Os tubos foram colocados em banho-maria, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), por alguns minutos, até derretimento da manteiga. Adicionou-se, a cada tubo, 5,0 mL de solução substrato de trabalho (fenilfosfato dissódico, 0,1% m/v) – concentração simples. Eles foram agitados e incubados em banho-maria a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), por exatamente 15 minutos, contados a partir do momento em que a temperatura no interior de um tubo controle contendo substrato fosse de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, seguiu-se a remoção dos tubos e a adição de 0,1 mL de solução CQC 0,3% m/v e 0,1 mL de catalisador sulfato de cobre (CuSO_4) 0,2% m/v, sendo novamente incubados por mais 5 minutos, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Após os 5 minutos, procedeu-se a transferência para o banho de gelo, com temperatura máxima de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, por, aproximadamente, 15 minutos. Retirou-se, com o auxílio de uma espátula, a fina camada sólida de gordura formada e a fase aquosa de cada tubo foi transferida para tubos limpos e previamente identificados. Adicionou-se 3,0 mL de butanol neutralizado e resfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inverteu-se 4 vezes em meio ciclo, ou seja, inverteu-se o tubo em 1 segundo e pausou-se mais 1 segundo (meio ciclo). Esse procedimento foi realizado por 4 vezes. Os tubos foram deixados em repouso por 2 minutos e então repetiu-se os passos de inversão (4 tempos em meio ciclo). Obteve-se, desta forma, a fase alcoólica contendo o indofenol produzido pela reação do CQC com o fenol originado da hidrólise do substrato pela ação da enzima ALP.

Os tubos permaneceram em repouso por 2 horas para que fosse possível a obtenção de uma camada alcoólica límpida (camada superior) e posterior análise visual e espectrofotométrica. Ambas as análises foram realizadas com base na comparação dos tubos das amostras com uma curva de calibração obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 μg de fenol equivalente por mL de solução.

2.2.1.1. Análise visual

Comparou-se a coloração dos tubos de cada amostra com a coloração do tubo correspondente ao controle negativo e com os tubos da curva de calibração. As amostras cujos tubos apresentaram coloração azulada, igual ou mais intensa que o tubo da curva de calibração que continha 1,0 µg de fenol /g de amostra, ou coloração mais intensa que o tubo do controle negativo, foram submetidas ao teste de reativação para confirmação do resultado positivo. Já as amostras que apresentaram coloração (translúcida) igual ao tubo da curva de calibração que continha 0,0 µg de fenol /g de amostra ou igual ao tubo do controle negativo foram consideradas negativas para presença de ALP residual e, portanto, obtidas de pasteurização adequada.

2.2.1.2. Análise espectrofotométrica

Realizou-se a determinação da absorbância da fase alcoólica dos tubos da curva de calibração e das amostras, em espectrofotômetro (Shimadzu, model 1240 UV-Visível), no comprimento de onda de 650nm. Para obtenção das concentrações de fenol em cada amostra analisada, em µg de fenol/g de manteiga, utilizou-se a equação da reta obtida por meio da leitura da curva de calibração e dos valores de absorbância líquida das amostras. Para amostras que continham um “branco” ou controle negativo, como é o caso da manteiga, subtraiu-se a absorbância deste branco da absorbância da amostra, obtendo-se assim a absorbância líquida (Murthy et al., 1992 e Rocco, 2004).

Segundo Rocco (2004), valores iguais ou superiores a 1,0 µg de fenol/g de manteiga é indicativo de pasteurização imprópria ou pós-contaminação com produtos não pasteurizados.

2.2.2. Avaliação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico

O equipamento Fluorophos[®] e todos os reagentes utilizados no método Fluorimétrico são fabricados exclusivamente pela Advanced Instrument.

Para preparo da amostra de manteiga utilizou-se os procedimentos descritos no manual do equipamento (Advanced, 1992). Pesou-se 0,5 g de cada

amostra de manteiga em um tubo de ensaio e adicionou-se 5,0 mL da solução tampão de extração (Cheese Extraction Buffer). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 38 °C, por 10 minutos. Cada tubo foi agitado em vortex na velocidade 7 por, exatamente, 1 minuto. Partindo-se desta solução, realizou-se a análise da atividade da ALP com o auxílio do equipamento Fluorophos®.

Dois mililitros da solução de substrato Fluorophos® foram adicionados em cubetas próprias e estas estabilizadas em bloco de aquecimento a 38 °C, por no mínimo, 20 minutos. Uma alíquota de 75,0 µL da solução tampão contendo a amostra foi retirada com pipetador próprio e adicionada aos 2,0 mL de substrato. A cubeta contendo a amostra e o substrato foi tampada com filme plástico tipo PVC, agitada rapidamente, seca com papel absorvente e inserida no porta cubeta do equipamento. A seleção do produto a ser analisado foi feita previamente, utilizando painel do equipamento.

Após o primeiro minuto necessário para que ocorresse a estabilização da temperatura, a taxa de fluorescência emitida por minuto (F/min) pela amostra foi medida automaticamente durante dois minutos. Uma unidade da enzima ALP corresponde à quantidade da enzima que catalisa a transformação de 1 µmol de substrato Fluorophos® por minuto por quilograma de amostra. Os resultados são expressos em miliunidades da enzima por quilograma de manteiga (mU/Kg), em função das baixas concentrações da enzima nos produtos finais. O resultado era exibido na tela do aparelho e impresso automaticamente. O valor obtido foi multiplicado por 10, que era o fator de diluição da amostra, já que utilizava-se na análise 0,5 g da amostra diluída em 5,0 mL de solução tampão.

Valores superiores a 350,0 mU/Kg indicam pasteurização imprópria ou contaminação do produto final com matéria-prima cru (FDA, 2003 e Rocco, 2004).

2.2.3. Teste de reativação

As amostras que apresentaram resultado positivo para ALP residual na primeira análise foram submetidas ao teste de reativação e analisadas novamente para confirmação deste resultado.

A diferenciação entre a fosfatase alcalina reativada e a residual é baseada no fato de que esta enzima é capaz de se reativar na presença de íons magnésio, a 34 °C por 1 hora, apresentando aumento de até 10 vezes na atividade, comparado ao mesmo produto incubado na ausência de íons magnésio (Kleyn e HO, 1977).

O modo de preparo dos tubos utilizados no teste de reativação pode ser visualizado no Quadro 1. Transferiu-se 5,0 mL da amostra a ser testada para dois tubos (1 e 2). Ao primeiro adicionou-se 0,1 mL de água destilada (Amostra) e ao segundo adicionou-se 0,1 mL de solução de acetato de magnésio 0,354 g/mL (Teste de Reativação).

Quadro 1 – Descrição dos tubos a serem analisados no teste de reativação.

Descrição	Tubo 1 – Amostra	Tubo 2 – Teste de Reativação
Amostra positiva a ser testada	5,0 mL	5,0 mL
Água	0,1 mL	---
Acetato de magnésio	---	0,1 mL

Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a 34 °C (\pm 1°C) por 1 hora. Após este período, transferiu-se 1,0 mL do tubo 2 para um outro tubo onde adicionou-se também 5,0 mL controle negativo para teste de reativação (manteiga tratada a 95 °C, por 1 minuto), obtendo-se assim a diluição 1+ 5.

Partindo-se deste novo tubo preparado (Teste de Reativação diluído 1 + 5) e do tubo 1 (Amostra) repetiu-se os procedimentos de análise já descritos anteriormente para o método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico, e realizou-se também a análise pelo método fluorimétrico.

2.2.4. Interpretação final dos resultados

Quando a atividade da ALP correspondente à amostra diluída (Teste de Reativação diluído 1 + 5) era igual ou superior à atividade da amostra sem a adição de magnésio, o resultado foi considerado negativo para ALP residual e indicava reativação, não confirmando assim o resultado positivo da primeira

análise. Porém, quando a atividade do Teste de Reativação diluído 1 + 5 era inferior à atividade da amostra sem a adição de magnésio, o resultado positivo inicial foi confirmado e a amostra foi considerada positiva para ALP residual.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as vinte amostras de manteigas comerciais analisadas em relação à atividade residual da ALP, quatro apresentaram resultado positivo, o que indicou uma possível pasteurização ineficiente ou pós-contaminação com matéria-prima não pasteurizada (Quadro 2).

Os resultados positivos foram confirmados com a realização do teste de reativação e repetição das análises pelos métodos: Scharer, visual e espectrofotométrico, e o método fluorimétrico.

Foi possível distinguir claramente a ALP residual da reativada após o teste de reativação por todos os métodos utilizados, obtendo-se o mesmo resultado em todos eles.

Quadro 2 – Resultado da atividade da ALP nas amostras comerciais positivas após o teste de reativação pelo método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico (μg de fenol/g de amostra) e o método fluorimétrico (mU/Kg de amostra).

Marca	Scharer Visual*		Scharer Espectrofotométrico		Fluorimétrico		Conclusão
	Amostra	Reativação (1 +5)	Amostra	Reativação (1 +5)	Amostra	Reativação (1 +5)	
A2	+	-	0,18	-0,14	467,0	177,0	Positivo
A4	++++++	+++++	16,21	13,71	52.730,0	50.430,0	Positivo
B1	++	+	0,81	0,35	1.770,0	809,0	Positivo
E1	++	++++	1,33	3,26	3.737,0	6.693,0	Negativo
E3	+++++	++++	10,23	3,09	39.300,0	2.023,0	Positivo
E4	++	+++	1,03	1,61	2.777,0	3.535,0	Negativo

* o número de cruzes é proporcional à intensidade da coloração azul.

As amostras A4 e E3 apresentaram valores elevados para a atividade residual da ALP em ambos os métodos quantitativos. Para a amostra A4, encontrou-se uma atividade residual de 16,21 μg de fenol/g de amostra pelo

método rápido de Scharer espectrofotométrico e 52.730,0 mU/Kg pelo método fluorimétrico. Os valores encontrados para a amostra E3 foram de 10,23 µg de fenol/g e 39.300,0 mU/Kg. Se considerarmos os limites internacionais de 1,0 µg de fenol/g de amostra (Scharer espectrofotométrico) e 350,0 mU/Kg de amostra (fluorimétrico), estes valores representam aumentos consideráveis, chegando a extrapolar 16 vezes o limite para o método espectrofotométrico e 150 vezes para o fluorimétrico. Valores tão altos, possivelmente, estão associados à contaminação com grande quantidade de produto não pasteurizado ou até mesmo com a fabricação da manteiga a partir do creme cru.

Duas amostras, uma da marca A e outra da marca B, apresentaram resultados positivos confirmados pelo Scharer visual e pelo método fluorimétrico, apesar de apresentarem, pelo Scharer espectrofotométrico, valores inferiores ao limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra. Isso pode ser explicado pelo fato de que o limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra estabelecido para o método rápido de Scharer espectrofotométrico corresponde a valores muito superiores a 350,0 mU/Kg.

Duas das quatro amostras da marca E apresentaram reativação da ALP. A reativação pode ocorrer em manteigas obtidas a partir de creme submetido a condições de pasteurização com baixo tempo de retenção e mantidas estocadas em temperaturas elevadas. Ela pode ser evitada se o produto for devidamente resfriado após a pasteurização, já que o armazenamento a temperaturas superiores a 10 °C favorece a reativação (Murthy et al., 1976).

Após a confirmação dos resultados positivos, pôde-se concluir que a marca A foi a que apresentou maior percentual de resultados positivos confirmados (50%), seguida das marcas B e E, ambas com 25%. Nenhuma das amostras analisadas das marcas C e D apresentaram resultados positivos para a atividade residual da ALP. Dentre as três amostras inicialmente positivas da marca E, apenas em uma delas a presença de atividade residual da ALP foi confirmada, pois nas outras duas tratava-se de reativação da enzima (Quadro 3).

Quadro 3 – Resultados obtidos para as amostras de manteigas comerciais pelo método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico e fluorimétrico.

Marca	Total de resultados positivos	ALP Residual	ALP Reativada
A	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)
B	1 (25%)	1 (25%)	0 (0%)
C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
D	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
E	3 (75%)	1 (25%)	2 (50%)

Sobre a viabilidade de microrganismos patogênicos em manteiga (pH = 6,4 e 78,0% de gordura), Holliday et al. (2003) verificaram que *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* foram capazes de crescer no produto em um intervalo de 1 a 2 dias após a contaminação intencional e estocagem do produto a 21 °C. *Listeria monocytogenes* também foi capaz de crescer na manteiga estocada a 4,4 °C, após 7 a 14 dias de incubação.

Ao estudar a ocorrência da reativação, Bradley (2002) verificou que uma manteiga fabricada a partir de creme pasteurizado, a 85 °C, por 15 segundos, apresentou uma atividade menor que 10,0 mU/Kg, logo após a fabricação. Porém, quando estocada em temperaturas entre 9 e 11 °C constatou uma atividade de 1.750,0 mU/Kg após 4 dias e de 2.500,0 mU/Kg no 25º dia.

4. CONCLUSÃO

Com base nos limites internacionais em vigor (FDA, 2003), 20% das amostras de manteigas comerciais analisadas encontravam-se em desacordo com os padrões para atividade residual da ALP. Logo, o creme utilizado na fabricação destas manteigas foi pasteurizado de forma ineficiente ou foi contaminado posteriormente com creme cru, podendo o produto final constituir um veículo de microrganismos patogênicos e deterioradores, colocando em risco a saúde do consumidor, a qualidade e a vida de prateleira do produto.

Os resultados desta pesquisa reforçam a importância e a necessidade de estabelecer, no Brasil, esta análise como procedimento obrigatório de rotina para averiguação da qualidade da manteiga, como já é estabelecido para o leite pasteurizado e como já acontece em países da Europa e da América do Norte para a manteiga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANCED INSTRUMENTS. **The advanced[®] fluorometer – user’s manual.** **Advanced Instruments** Inc. Dairy and Food Technology Division, Needham Heights, Massachusetts, 1992.

BRADLEY, R.L. Alkaline phosphatase monitoring revisited. **Dairy Pipeline.** Wisconsin Center for Dairy Research. v. 14. nº 2. p. 4-8, 2002.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga.** 1996.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. **Dairy Science Facts.** Department of Food Sciences. Stocking Hall, Ithaca, NY 14853, 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - CFSAN/Office of Compliance. **Grade “A” Pasteurized Milk Ordinance.** Public health service publication (2003 Revision). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Washington. DC. 340 p. 2003.

FOX, P.F., KELLY, A.L., Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – part 2. **International Dairy Journal.** v. 16, p. 517-532, 2006.

FOX, P.F. Chapter IV: Phosphatases in Milk. In: **Advanced dairy chemistry – Proteins**. Elsevier applied science, p. 322-325, London and New York. 1992.

HOLLIDAY, S.L., ADLER, B.B., BEUCHAT, L.R. Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in butter, yellow fat spreads, and margarine as affected by temperature and physical abuse. **Food Microbiology**. v. 20. p. 159-168, 2003.

KARMAS, R., KLEYN, D.H. Determination and interpretation of alkaline phosphatase activity in experimental and commercial butters. **Journal of Dairy Science**. v. 73. n° 3. p. 584-589, 1990.

KLEYN, D. H., HO, C. Rapid determination of alkaline phosphatase reactivation. **Journal of the A.O.A.C.** v. 60. n° 6. p. 1389-1391, 1977.

MAIJALA, R., LYYTIKÄINEN, O., JOHANSSON, T., AUTIO, T., AALTO, T., HAAVISTO, L., HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemia caused by butter in Finland. **International Journal of Food Microbiology**. v. 70. p. 97-109, 2001.

MURTHY, G.K., KLEYN, D.H., RICHARDSON, T., ROCCO, R.M. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 16th Edition. Edited by Robert T. Marshall. p. 412-430, NW Washington, DC. 1992.

MURTHY, G. K.; COX, S.; KAYLOR, L. Reactivation of alkaline phosphatase in ultra high-temperature, short-time processed liquid milk products. **Journal of Dairy Science**. v. 59. n°. 10. p. 1699-1710, 1976.

ROCCO, R.M., FITTS, J. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 17th Edition. p. 341-362, NW Washington, DC. 2004.

ARTIGO 3

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER, VISUAL E ESPECTROFOTOMÉTRICO, PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM MANTEIGA

RESUMO

A determinação da fosfatase alcalina (ALP) residual é usada na indústria de laticínios há mais de 60 anos para verificação da eficiência da pasteurização. Todavia, trabalhos sobre a atividade desta enzima em manteiga são escassos, principalmente no Brasil. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade e o limite de detecção do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, para a análise da atividade da ALP em manteiga, em comparação com o método fluorimétrico, cujo limite estabelecido pela FDA é de 350,0 mU/Kg de produto. Manteigas foram fabricadas a partir de creme pasteurizado adicionado de quantidades de 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v) de creme cru. Pelo método rápido de Scharer visual foi possível detectar a atividade residual da enzima somente a partir de concentrações de 0,050% de creme cru, adicionado ao creme pasteurizado. Portanto, sua sensibilidade não foi condizente com a do método fluorimétrico. O método espectrofotométrico foi mais sensível e por meio dele foi possível detectar a concentração de creme cru correspondente ao limite estabelecido. O método visual e o espectrofotométrico foram mais sensíveis para a análise da ALP em manteiga do que para leite fluido e queijo tipo minas padrão, estudados em outros trabalhos. Para que o método rápido de Scharer seja utilizado com segurança, modificações precisam ser realizadas para torná-lo mais sensível e eliminar os problemas associados à sua realização.

1. INTRODUÇÃO

A determinação da fosfatase alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) residual é usada na indústria de laticínios há mais de 60 anos. Em condições insuficientes de pasteurização, a enzima é reduzida a concentrações acima das consideradas apropriadas, o que pode indicar pasteurização ineficiente ou pós-contaminação com matéria-prima crua (Rocco, 2004).

Análises laboratoriais para determinação da atividade da ALP são baseadas no princípio de que a enzima hidrolisa ésteres monofosfatados em temperatura e pH determinados, o que leva a liberação de compostos que podem ser detectados por reações colorimétricas, fluorescência ou luminescência. (Murthy et al., 1992 e Fox e Kelly, 2006).

Em função do método utilizado, o limite de detecção varia entre 0,1% a 0,5% v/v, para maioria dos métodos colorimétricos, de leite cru adicionado, podendo-se obter um limite de detecção de 0,006% v/v quando se utiliza o método fluorimétrico (Rocco, 1990 e Claves et al., 2002).

O método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico é um teste colorimétrico clássico para determinação da ALP (Cornell, 1998). O substrato fenilfosfato de sódio, sob ação da enzima, libera fenol. O fenol reage com CQC (2,6-dicloroquinona 4-cloroimida) formando o indofenol, de coloração azul. O composto formado é detectado visualmente ou espectrofotometricamente por comparação com uma curva de calibração de solução de fenol em água (Murthy et al., 1992 e Rocco, 2004).

No método fluorimétrico (Fluorophos®) o produto da reação é fluorescente. Trata-se de um método rápido, muito sensível e atualmente, além do método de quimiluminescência (Charm Test), é aceito pela Food and Drugs Administration (FDA) para análise da ALP em leite e produtos lácteos. O limite máximo permitido é de 350,0 miliunidades (mU) de enzima por litro ou quilograma de produto (FDA, 2003).

Informações sobre a atividade residual da ALP em manteiga, e de avaliações da sensibilidade e dos limites de detecção para este produto são escassas. Fato que ocorre principalmente no Brasil, onde a análise da ALP não é um procedimento analítico obrigatório pela legislação vigente para verificação da

eficiência da pasteurização do creme usado para a fabricação da manteiga (BRASIL, 1996). A maioria dos trabalhos internacionais tem como objeto de pesquisa produtos fluidos, como leite integral e desnatado, leite achocolatado e creme de leite com baixo teor de gordura (Rocco, 1990; Painter, 1995; Angelino et al., 1999 e Rampling et al., 2004).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, na determinação da atividade residual da ALP em manteiga, comparando-o com o método fluorimétrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padronização do creme cru, pasteurização e maturação

Creme cru integral foi obtido no Laticínios Escola da Universidade Federal de Viçosa.

Após a análise do teor de gordura pelo método butirométrico de Gerber, foi realizada a padronização para 40,0% a 41,0% de gordura com água destilada ou leite desnatado. Em seguida o creme foi submetido ao tratamento térmico de 85°C, por 30 minutos. Após os 30 minutos, o creme foi imerso em banho de gelo, por, aproximadamente, 30 minutos, até que atingisse temperatura inferior a 20 °C, e estocado em geladeira por uma noite, para que ocorresse a maturação.

2.2. Fabricação das manteigas em escala laboratorial

O creme padronizado, pasteurizado e maturado foi adicionado de creme cru nas proporções de 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v). Após a mistura homogênea, deu-se início a bateção em batedeira doméstica da marca Walita, inicialmente na velocidade "1" e, posteriormente, na velocidade "2", até obtenção da manteiga. O leiteiro foi drenado, a manteiga foi lavada por duas vezes com água gelada, usando-se em cada lavagem o mesmo volume de leiteiro retirado. Foram adicionados 2,0% (m/m) de sal em relação ao peso da manteiga

obtida. O produto final foi armazenado em embalagens de polietileno e congelado a -15 °C, até o momento da análise.

2.3. Determinação da atividade da ALP no creme cru padronizado

A determinação da atividade da ALP, no creme cru padronizado usado nas fabricações das manteigas, foi realizada em duplicata pelo método fluorimétrico, segundo a metodologia descrita por Rocco (2004), no Standard Methods for the Examination of Dairy Products. O equipamento Fluorophos[®] e todos os reagentes utilizados no método fluorimétrico são fabricados exclusivamente pela Advanced Instrument.

Em função da alta atividade da enzima no creme cru, foi necessário realizar uma diluição 1:1000 (v/v) do creme em água destilada, antes de submetê-lo à análise fluorimétrica.

A dois mililitros da solução de substrato Fluorophos[®], adicionados em cubetas próprias, previamente estabilizadas em bloco de aquecimento a 38 °C, por no mínimo 20 minutos, transferiu-se uma alíquota de 75,0 µL da amostra diluída preparada. A cubeta, com a amostra e o substrato, foi tampada com filme plástico tipo PVC, agitada rapidamente, seca com papel absorvente e inserida no porta cubeta do equipamento.

Após o primeiro minuto, necessário para que ocorresse a estabilização da temperatura, a taxa de fluorescência emitida pela amostra por minuto (F/min) foi medida, automaticamente, durante dois minutos. Uma unidade da enzima ALP corresponde à quantidade da enzima que catalisa a transformação de 1,0 µmol de substrato Fluorophos[®], por minuto, por litro de amostra. Os resultados foram expressos em miliunidades da enzima por litro de creme (mU/L), em função das baixas concentrações da enzima encontrada nos produtos finais. O valor obtido foi multiplicado por 1.000 (fator de diluição da amostra).

2.4. Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas fabricadas

As manteigas fabricadas em cada repetição, foram analisadas quanto à atividade da ALP pelos métodos rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, e

pelo método fluorimétrico (Fluorophos®), após 24h a 48h de fabricação, e foram mantidas congeladas até o momento de realização das análises.

Utilizou-se as metodologias descritas por Rocco, no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (2004).

2.4.1. Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico

As amostras congeladas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) foram pesadas em porções de 0,5 g diretamente nos tubos de ensaio, em triplicata. Pesou-se também 0,5 g do controle negativo, representado pela amostra de manteiga tratada a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 minuto. Os tubos foram colocados em banho-maria, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), por alguns minutos, até derretimento da manteiga. Adicionou-se, a cada tubo, 5,0 mL de solução substrato de trabalho (fenilfosfato dissódico, 0,1% m/v) – concentração simples. Eles foram agitados e incubados em banho-maria a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), por, exatamente, 15 minutos, contados a partir do momento em que a temperatura no interior de um tubo controle com substrato atingiu $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, seguiu-se a remoção dos tubos e a adição de 0,1 mL de solução CQC 0,3% m/v e 0,1 mL de catalisador sulfato de cobre (CuSO_4) 0,2% m/v, sendo novamente incubados por mais 5 minutos, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Após os 5 minutos, procedeu-se a transferência para o banho de gelo, com temperatura máxima de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente, 15 minutos. Retirou-se, com o auxílio de uma espátula, a fina camada sólida de gordura formada e a fase aquosa de cada tubo foi transferida para tubos limpos e previamente identificados. Adicionou-se 3,0 mL de butanol neutralizado e resfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inverteu-se 4 vezes em meio ciclo, ou seja, inverteu-se o tubo em 1 segundo e pausou-se mais 1 segundo (meio ciclo). Esse procedimento foi realizado por 4 vezes. Os tubos foram deixados em repouso por 2 minutos e então repetiu-se os passos de inversão (4 tempos em meio ciclo). Obteve-se, desta forma, a fase alcoólica contendo o indofenol produzido pela reação do CQC com o fenol originado da hidrólise do substrato pela ação da enzima ALP.

Os tubos permaneceram em repouso por 2 horas para que fosse possível a obtenção de uma camada alcoólica límpida (camada superior) e posterior análise visual e espectrofotométrica. Ambas as análises foram realizadas com base na

comparação dos tubos das amostras com uma curva de calibração obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de fenol equivalente por mL de solução.

2.4.1.1. Análise visual

Comparou-se a coloração dos tubos de cada amostra com o tubo do controle negativo e com os tubos da curva de calibração. As amostras cujos tubos apresentaram coloração azulada, igual ou mais intensa que o tubo da curva de calibração que continha 1,0 µg de fenol /g de amostra, ou coloração mais intensa que o tubo do controle negativo, foram consideradas positivas, para a atividade residual da ALP. Já as amostras que apresentaram coloração (translúcida) igual ao tubo da curva de calibração que continha 0,0 µg de fenol/g de amostra ou igual ao tubo do controle negativo foram consideradas negativas.

2.4.1.2. Análise espectrofotométrica

Realizou-se a determinação da absorbância da fase alcoólica dos tubos da curva de calibração e das amostras, em espectrofotômetro (Shimadzu, model 1240 UV-Visível) no comprimento de onda de 650nm. Para obtenção das concentrações de fenol em cada amostra analisada, em µg de fenol/g de manteiga, utilizou-se a equação da reta obtida por meio da leitura da curva de calibração e dos valores de absorbância líquida das amostras. Para amostras que tinham um “branco” (controle negativo), como era o caso da manteiga, subtraiu-se a absorbância deste branco da absorbância da amostra e obteve-se assim a absorbância líquida (Murthy et al., 1992 e Rocco, 2004).

2.4.2. Avaliação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico

Para o preparo da amostra de manteiga utilizou-se os procedimentos descritos no manual do equipamento (Advanced, 1992). Pesou-se 0,5 g de cada amostra de manteiga em um tubo de ensaio e adicionou-se 5,0 mL da solução tampão de extração (Cheese Extraction Buffer). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria, a 38 °C, por 10 minutos. Cada tubo foi agitado em

Vortex na velocidade 7, por, exatamente, 1 minuto. Partindo-se da solução aquosa, realizou-se a análise da atividade da ALP no equipamento Fluorophos® (Advanced, 1992).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Variação da atividade da ALP no creme cru padronizado

As amostras de creme cru usadas na fabricação das manteigas, nas 10 repetições realizadas, foram obtidas durante os meses de maio, junho e julho, e apresentaram os valores mínimo, máximo e médio para a atividade da ALP descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Atividade da ALP, determinada pelo método fluorimétrico, no creme cru padronizado utilizado para fabricação das manteigas nas 10 repetições.

Valor encontrado	Atividade de ALP (mU/L)
Mínimo	9.872.500
Máximo	28.733.500
Médio	16.644.150
Coeficiente de variação (CV %)	30,08

Em função destas variações, a quantidade de creme cru adicionada ao creme pasteurizado que correspondia a uma atividade residual da ALP de 350,0 mU/Kg na manteiga encontrou-se dentro do intervalo de 0,010% a 0,025% (v/v).

Ao estudar a atividade da ALP pelo método fluorimétrico em leite fluido integral na primavera e no verão, Castro (2005) encontrou valores de atividade entre 516.800 e 1.519.800 mU/L. A autora verificou que a adição de 0,025% a 0,050% (v/v) de leite cru ao leite pasteurizado correspondia ao limite de 350,0 mU/L estabelecido pela FDA (2003).

A diferença nos valores encontrados para creme de leite e leite pode ser explicada principalmente pelo fato de haver uma maior concentração da enzima na fração gordurosa dos produtos lácteos. A enzima, apesar de não ser

lipossolúvel, encontra-se adsorvida entre os glóbulos de gordura (Painter, 1995 e Clayer et al., 2002). Logo, a quantidade de creme cru necessária para se atingir o limite máximo permitido de atividade residual da ALP é muito inferior que a quantidade de leite cru necessária, sem levar em consideração fatores como estação do ano, período de lactação, entre outros.

3.2. Resultados da atividade residual da ALP nas manteigas pelos método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico e pelo método fluorimétrico.

Em função da dificuldade de se comparar as tonalidades de azul obtidas na análise das amostras e as obtidas na curva padrão, comparou-se os resultados com o controle negativo (manteiga tratada a 95 °C, por 1 minuto) e com o tubo 1,0 µg/mL da curva de calibração (Quadro 2).

Em comparação com o controle negativo, foi possível distinguir o resultado positivo a partir da adição de 0,025% de creme cru, sendo que para as concentrações de 0,050% e 0,100% obteve-se resultados positivos em todas as repetições realizadas.

Já em comparação com o tubo 1,0 µg/mL da curva de calibração, apenas 30,0% das amostras contaminadas com 0,025% de creme cru apresentaram resultado positivo, o que indica uma menor sensibilidade quando se utiliza esta forma de comparação.

Soares (2003), ao trabalhar com leite fluido e queijo minas padrão, também encontrou dificuldades na comparação visual da curva de calibração com as amostras analisadas. Queijos tipo mussarela, ricota, minas frescal e minas padrão foram analisados por Oliveira et al. (2005), quanto à atividade residual da ALP, concluindo que a curva de calibração utilizada foi inapropriada para a interpretação visual dos resultados, devido à grande variação nas tonalidades de azul obtida para os diferentes tipos de queijos.

Métodos fluorimétricos (Rocco, 1990 e Fenoll et al., 2002) utilizam curvas de calibração para cada produto analisado, sendo as concentrações conhecidas do produto de reação adicionadas a uma amostra do produto a ser testado. Já o método rápido de Scharer utiliza uma mesma curva para todos os produtos lácteos, elaborada a partir de soluções de fenol em água. Como os constituintes

dos produtos influenciam na tonalidade da coloração obtida, os padrões podem não corresponder a esta variação de tonalidade, o que dificulta a interpretação dos resultados.

No método espectrofotométrico foi possível detectar a presença de atividade da ALP a partir de 0,010% de creme cru, mas só em concentrações acima de 0,050% atingiu-se o limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra. Este limite é citado por Rocco (2004) como a concentração residual de enzima que indica pasteurização imprópria ou contaminação com matéria-prima não pasteurizada, o que equivaleria a, aproximadamente, 0,10% de contaminação com creme cru. Observou-se que, para a manteiga, esse valor seria aproximadamente a metade, ou seja, 0,050% de creme cru adicionado ao creme pasteurizado (Quadro 2).

Quadro 2 – Comparação dos resultados obtidos pelo método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, e fluorimétrico, nas 10 repetições realizadas.

Creme cru % (v/v)	Scharer Visual		Espectrofotométrico (µg de fenol/g)	Fluorimétrico (mU/Kg)
	CN*	Padrão** (1,0 µg/mL)	Valores médios	Valores médios
0,000	0 (0%)	0 (0%)	-0,06 ± 0,10	ND***
0,010	0 (0%)	0 (0%)	0,08 ± 0,12	ND***
0,015	1 (10%)	1 (10%)	0,19 ± 0,16	348,9 +/- 83,4
0,025	8 (80%)	3 (30%)	0,33 ± 0,23	544,1 +/- 89,3
0,050	10 (100%)	10 (100%)	0,83 ± 0,38	1.144,7 +/- 331,2
0,100	10 (100%)	10 (100%)	1,72 ± 0,62	ND***

*comparando os tubos com a coloração obtida no Controle Negativo (CN).

**comparando com o tubo da curva padrão que contém 1,0 µg de fenol equivalente/mL.

*** ND = não determinado.

O alto desvio padrão pode ser explicado pela variação da atividade da ALP no creme cru utilizado nas diferentes repetições, conforme relatado por Castro (2005), na análise de leite fluido.

O método de Scharer espectrofotométrico para a análise de manteiga apresentou linearidade de resposta para as adições de creme cru (v/v) utilizadas. Ao relacionar a porcentagem de creme cru adicionada (v/v) e a quantidade de μg de fenol/g de amostra, obteve-se a equação: $\hat{y} = 18,044X - 0,0865$ e coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9989. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0,9995, o que implica em forte relação entre a quantidade de creme cru adicionada e a atividade residual da ALP em manteiga.

Em cada repetição, analisou-se, pelo método fluorimétrico, a manteiga com menor concentração de creme cru adicionado que apresentava resultado visual positivo pelo método rápido de Scharer e a de maior concentração que apresentava resultado visual negativo. Com estas análises, pretendeu-se estabelecer a comparação da sensibilidade e do limite de detecção do método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, com o método fluorimétrico.

Ao comparar os três métodos utilizados e ao adotar como parâmetro o valor de atividade de ALP estabelecido atualmente pela FDA de 350,0 mU/Kg, pelo método fluorimétrico, pode-se concluir que o método rápido de Scharer visual não foi sensível o suficiente para detectar este valor, e sim apenas valores para a enzima, em média, superiores a 1.000 mU/Kg de manteiga. No entanto, para a manteiga, este método foi mais sensível do que para leite fluido, como indicam os trabalhos de Castro (2005), que apenas detectou a presença de ALP pelo método visual com a adição de no mínimo 1,0% de leite cru ao pasteurizado, o que correspondia a uma atividade próxima a 8.000 mU/L de leite. Ao analisar queijo minas padrão pelo mesmo método, Soares (2003) concluiu que somente a partir de concentrações de 0,50% de leite cru era possível detectar resultados positivos nas amostras de queijo pelo método visual, o que evidencia a maior sensibilidade do método rápido de Scharer visual para manteiga, em relação aos outros dois produtos estudados.

A maior sensibilidade do método visual para manteiga pode ser associada, principalmente, à maior atividade da ALP no creme do que no leite e, também, provavelmente, por características intrínsecas do produto, o que possibilita a melhor visualização da coloração azul na manteiga do que em amostras de leite e de queijo.

Uma atividade da ALP de aproximadamente 350,0 mU/Kg de manteiga correspondeu, em média a 0,19 µg de fenol/g de amostra, pelo método espectrofotométrico. Este valor foi relacionado a quantidades adicionadas de creme cru que variaram entre 0,010 a 0,025% (v/v), sendo que na maioria das repetições este valor foi igual a 0,015% (v/v).

A relação encontrada entre a porcentagem de creme cru adicionada e a atividade residual da ALP na manteiga, torna evidente o fato de que o limite de 1,0 µg de fenol/g de amostra estabelecido para este método corresponde a valores muito superiores ao limite de 350,0 mU/Kg. No caso da manteiga, 0,050% de contaminação com creme cru corresponderam a valores médios de 1144 mU/kg. Logo, este limite residual da atividade da ALP deve ser revisto e determinado para cada produto lácteo individualmente, de forma que para todos eles o limite estabelecido seja equivalente ao valor máximo de de 350,0 mU/kg, pelo método fluorimétrico.

Dentre os métodos utilizados, o fluorimétrico é o mais rápido, apresenta alta especificidade para atividade da ALP, alta sensibilidade, baixo limite de detecção, quantificação automática da atividade da enzima e registro impresso. Porém, apresenta a desvantagem de possuir alto custo por análise e grande demora na entrega dos reagentes, já que todos eles são importados e fornecidos unicamente pela Advanced Instruments, detentora da patente do método.

O método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, apresentou, para análise de manteiga, algumas limitações. Observou-se a dificuldade de se comparar a coloração das amostras com a coloração da curva de calibração, em função das diferenças na tonalidade da coloração azul. Era constante a ocorrência de contaminações pela presença de fenol livre nas vidrarias utilizadas e instabilidade dos reagentes preparados, o que demonstra a inespecificidade do método.

Problemas semelhantes foram citados por Soares (2003). A autora explicitou a necessidade do uso de 30,0 mL de butanol para garantir que todo fenol livre fosse retirado da solução de substrato, o que foi confirmado no presente trabalho. O método oficial determina o uso de apenas 3,0 mL para realização desta extração.

Curvas de calibração semelhantes às realizadas por Castro (2005) na determinação espectrofotométrica foram obtidas no presente trabalho, como, por exemplo, $\hat{y} = 0,0601X + 0,0063$ e $r^2 = 0,9997$. No entanto, diferiram bastante das utilizadas por Soares (2003), que encontrou valores de $\hat{y} = 0,0374X - 0,0018$ e $r^2 = 0,9999$. Segundo a autora, a coloração azul só era perceptível a partir do padrão correspondente a 5,0 μg de fenol/mL. Entretanto, neste estudo, apesar de se tratar de uma coloração azulada bastante suave, foi possível observá-la a partir do padrão contendo 1,0 μg de fenol/mL. No decorrer das análises observou-se que a forma e a velocidade de inversão dos tubos da curva de calibração para extração do indofenol interferiam diretamente nos resultados. Esta etapa do procedimento analítico não é muito bem detalhada na metodologia, que cita apenas que os tubos devem ser invertidos por 6 voltas completas. Esta subjetividade dá margem à ocorrência das variações acima citadas, e podem comprometer assim, os resultados do trabalho desenvolvido.

4. CONCLUSÃO

O método rápido de Scharer visual possui limite de detecção superior ao correspondente a 350,0 mU/Kg, portanto, não apresentou sensibilidade satisfatória para determinação visual da ALP em manteiga.

O método espectrofotométrico foi mais sensível que o visual, e foi capaz de detectar a atividade da ALP na manteiga correspondente a atividade de 350,0 mU/Kg, porém, observa-se a necessidade de implementar modificações na metodologia, além de determinar um novo limite, pois a quantidade de fenol correspondente ao limite do método fluorimétrico é bem inferior ao limite de 1,0 μg de fenol/g de amostra estipulado para esta análise.

Apesar dos problemas expostos, o método rápido de Scharer é bastante difundido, de preço mais acessível, e possível de ser utilizado nos laboratórios como análise de rotina para atividade da ALP, desde que tomados os devidos cuidados em sua realização e que sejam realizadas modificações no intuito de garantir uma sensibilidade condizente como método fluorimétrico e a confiabilidade dos resultados encontrados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANCED INSTRUMENTS. **The advanced[®] fluorometer – user's manual.** Advanced Instruments Inc. Dairy and Food Technology Division, Needham Heights, Massachusetts. 1992.

ANGELINO, P.D., CHRISTEN, G.L., PENFIELD, M.P., BEATTIE, S. Residual alkaline phosphatase activity in pasteurized milk heated at various temperatures – measurement with the Fluorophos and Scharer rapid phosphatase tests. **Journal of Food Protection.** v. 62. nº 1. p. 81-85, 1999.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga.** 1996.

CASTRO, P.R.S. Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal de Viçosa. 51 p. 2005.

CLAEYS, W.L., LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. **Trends in Food Science & Technology.** v. 13. p. 293-311, 2002.

CORNELL UNIVERSITY – COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES. Alkaline phosphatase testing for milk pasteurization. **Dairy Science Facts.** Department of Food Sciences. Stocking Hall, Ithaca, NY 14853. 1998.

FENOLL, J., JOURQUIN, G., KAUFFMANN, J.M. Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products. **Talanta.** v. 56. p. 1021-1026, 2002.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - CFSAN/Office of Compliance. Grade "A" **Pasteurized Milk Ordinance**. Public health service publication (2003 Revision). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Washington. DC. 340 p. 2003.

FOX, P.F., KELLY, A.L., Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – part 2. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 517-532, 2006.

HETRICK J.H., TRACY, P.H. Effect of high-temperature short-time heat treatments on some properties of milk. I. Inactivation of the phosphatase enzyme. **Journal of Dairy Science**. v. 31. p. 867-879, 1948.

KELLY, A.L., FOX, P.F. Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 707-715, 2006.

MURTHY, G.K., KLEYN, D.H., RICHARDSON, T., ROCCO, R.M. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 16th Edition. Edited by Robert T. Marshall. p. 412-430, NW Washington, DC. 1992.

OLIVEIRA, A.M.G., NEVES, V.J., BOAVENTURA, R.L., PIRES, L.L., LIMA, L.L. Análises de fosfatase alcalina residual em queijos inspecionados pelo Estado de Minas Gerais. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. p. 427-430, Juiz de Fora-MG. 2005.

PAINTER, C.J. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time/temperature treatments. **Thesis (Master of Science)**. University of Wisconsin-Madison. 119 p. 1995.

RAMPLING, A.M., GREENWOOD, M.H., DAVIES, G.E.N. Use of a fluorimetric test for a bovine alkaline phosphatase to demonstrate under-pasteurization of skimmed milk and cream. **International Dairy Journal**. v. 14. p. 691-695, 2004.

ROCCO, R.M., FITTS, J. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 17th Edition. Edited by H. Michael Wehr and Joseph F. Frank. p. 341-362, NW Washington, DC. 2004.

ROCCO, R.M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. **Journal of Food Protection**. v. 53. nº 7. p. 588-591, 1990.

SOARES, C.F. Avaliação de métodos colorimétricos qualitativos e quantitativos para a determinação de atividade de fosfatase alcalina em leite e queijo minas padrão. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. 45 p. 2003.

ARTIGO 4

MODIFICAÇÃO DO MÉTODO RÁPIDO DE SCHARER E AUMENTO DE SUA SENSIBILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA RESIDUAL EM MANTEIGA

RESUMO

O método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, foi modificado com o objetivo de aumentar sua sensibilidade e torna-lo semelhante ao método fluorimétrico para a determinação da atividade residual da fosfatase alcalina (ALP) em manteiga. No método modificado, usou-se alíquotas de 0,5 mL de fase aquosa para a análise da atividade da ALP, em substituição à alíquota de 0,5 g de manteiga, utilizada no método convencional. A fase aquosa foi obtida a partir da fusão da manteiga, a 45 °C, e subsequente centrifugação a 1200 x *g* por, 10 minutos. Nas seis repetições realizadas, foi possível distinguir, visualmente, as manteigas com atividade próxima a 350,0 mU/Kg, dos controles negativos e de interferentes. A análise da fase aquosa destas manteigas apresentou coloração esverdeada (resultado positivo), já para as manteigas pasteurizadas e para os controles, a coloração obtida foi amarela (resultado negativo). Na análise espectrofotométrica, obteve-se o valor médio para a atividade residual da ALP de 0,115 µg de fenol por amostra (0,5 g de manteiga), ao utilizar o método rápido de Scharer convencional, e 0,385 µg de fenol por amostra (0,5 mL de fase aquosa), utilizando o método modificado. Estes valores sugerem que a sensibilidade do método convencional foi aumentada em aproximadamente 3,3 vezes. O método modificado apresentou limite de detecção da atividade da ALP de acordo com os estabelecidos pela Food and Drugs Administration (FDA), e representa uma alternativa de custo mais acessível para a determinação de baixas concentrações residuais desta enzima em manteiga.

1. INTRODUÇÃO

A fosfatase alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) é uma enzima natural do leite (Rocco, 2004). A determinação da atividade residual da ALP é utilizada na indústria de laticínios para comprovar a eficiência do processo de pasteurização. A resistência térmica desta enzima é ligeiramente superior à das formas não esporuladas dos microrganismos patogênicos mais resistentes, que podem estar presentes no leite, e que são alvos do processo de pasteurização (Karmas et al., 1990).

Análises laboratoriais para a determinação da atividade da ALP são baseadas no princípio de que a enzima hidrolisa ésteres monofosfatados, e leva a liberação de compostos que podem ser detectados pelo desenvolvimento de coloração, fluorescência ou luz. A quantidade de enzima presente nos produtos lácteos é proporcional à intensidade dos produtos formados (Murthy et al., 1992 e Fox e Kelly, 2006).

Em função do método utilizado, o limite de detecção varia entre 0,1% a 0,5% v/v, para a maioria dos métodos colorimétricos, de leite cru adicionado, podendo-se obter limite de detecção de 0,006% (v/v), quando se utiliza métodos fluorimétricos (Rocco, 1990 e Claves et al., 2002).

Após grande surto de salmonelose, com o envolvimento de leite semi-desnatado pasteurizado, registrado nos Estados Unidos, em 1985, e que atingiu mais de 160.000 consumidores (Ryan et al., 1987), e associado ao desenvolvimento de metodologias mais sensíveis, a partir da década de 90, houve a necessidade de serem revistos os limites máximos legais estabelecidos para a atividade residual da ALP em leite e derivados.

Trabalhos de Eckner (1992) mostraram que *Listeria monocytogenes* e *Salmonella senftenberg* foram capazes de sobreviver no leite pasteurizado com atividade residual da ALP inferior ou igual a 500,0 mU/L, quando este microrganismo foi inoculado antes do tratamento térmico com quantidades iguais ou superiores a $1,0 \times 10^6$ UFC/mL destes microrganismos.

A partir de 2003, a Food and Drugs Administration (FDA), reduziu o limite de 500,0 mU/L para 350,0 mU/L, e passou a aceitar como métodos oficiais para esta análise apenas o fluorimétrico (Fluorophos) e o de quimiluminescência

(Charm Test). Com esta modificação, os métodos colorimétricos não mais apresentaram a sensibilidade adequada para detectar concentrações tão baixas de atividade residual da ALP.

De acordo com ROCCO (1990), o método fluorimétrico é de fácil utilização, rápido e sensível para detectar baixas concentrações da enzima. No entanto, sua grande desvantagem é o alto custo da análise.

O presente trabalho teve como objetivo adaptar uma metodologia, de forma a torná-la mais sensível para a determinação da atividade residual da ALP em manteiga, por meio da realização de modificações no método rápido de Scharer. As adaptações foram realizadas com o objetivo de obter uma metodologia que fosse adequada ao limite proposto pela FDA, ou seja, que apresentasse sensibilidade semelhante à do método fluorimétrico, mas que tivesse um menor custo, sendo mais acessível às indústrias de laticínios.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Padronização do creme cru, pasteurização e maturação

Creme cru integral foi obtido no Laticínios Escola da Universidade Federal de Viçosa.

Após a análise do teor de gordura, pelo método butirométrico de Gerber, foi realizada a padronização para 40,0% a 41,0% de gordura com água destilada ou leite desnatado. O creme foi submetido ao tratamento térmico de 85°C, por 30 minutos, seguido de imersão em banho de gelo, por aproximadamente, 30 minutos, até que atingisse temperatura inferior a 20 °C, e estocado em geladeira, por uma noite, para que ocorresse a maturação.

2.2. Fabricação das manteigas em escala laboratorial

O creme padronizado, pasteurizado e maturado era adicionado de creme cru nas proporções de 0,000%; 0,010%; 0,015%; 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v). Após mistura homogênea, dava-se início à bateção em batedeira doméstica da marca Walita, inicialmente na velocidade "1" e, posteriormente, na velocidade "2",

até obtenção da manteiga. O leiteiro foi drenado e a manteiga lavada, por duas vezes, com água gelada, e em cada lavagem utilizou-se o mesmo volume de leiteiro retirado. Foram adicionados 2,0% (m/m) de sal em relação ao peso da manteiga obtida. O produto final foi armazenado em embalagens de polietileno e congelado (-15 °C) até o momento da análise.

2.3. Determinação da atividade residual da ALP nas manteigas fabricadas

Foram realizadas 6 repetições, sendo analisadas em cada uma delas a manteiga controle (fabricada apenas com creme pasteurizado), a manteiga com atividade próxima a 350,0 mU/Kg e a manteiga com alta atividade da ALP (0,05% v/v de creme cru adicionado).

As manteigas fabricadas foram analisadas quanto à atividade da ALP pelo método fluorimétrico (apenas a manteiga de atividade próxima a 350,0 mU/Kg), pelo método rápido de Scharer, visual e espectrofotométrico, convencional e pelo método rápido de Scharer modificado, proposto neste trabalho.

2.3.1. Determinação da atividade da ALP pelo método fluorimétrico

O equipamento Fluorophos[®] e todos os reagentes utilizados no método Fluorimétrico são fabricados exclusivamente pela Advanced Instrument.

O preparo da amostra de manteiga seguiu os procedimentos descritos no manual do equipamento (Advanced, 1992). Pesou-se 0,5 g de cada amostra de manteiga, em tubo de ensaio, e adicionou-se 5,0 mL da solução tampão de extração (Cheese Extraction Buffer). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria, a 38 °C, por 10 minutos. Cada tubo foi agitado em vortex, na velocidade 7, por, exatamente, 1 minuto. A partir desta solução, realizou-se a análise da atividade da ALP no equipamento Fluorophos[®].

Dois mililitros da solução de substrato Fluorophos[®] foram adicionados em cubetas próprias e estabilizadas em bloco de aquecimento, a 38 °C por, no mínimo, 20 minutos. Alíquota de 75,0 µL da solução tampão, contendo a amostra, foi retirada com pipetador próprio e adicionada aos 2,0 mL de substrato. A cubeta, contendo a amostra e o substrato, foi tampada com filme plástico tipo PVC,

agitada rapidamente, seca com papel absorvente e inserida no porta cubeta do equipamento.

Após o primeiro minuto, necessário para que ocorresse a estabilização da temperatura, a taxa de fluorescência emitida pela amostra por minuto (F/min) foi medida, automaticamente, durante dois minutos. Uma unidade da enzima ALP corresponde à quantidade da enzima que catalisa a transformação de 1 μ mol de substrato Fluorophos®, por minuto, por quilograma de amostra. Os resultados são expressos em miliunidades da enzima por quilograma de manteiga (mU/Kg), em função das baixas concentrações da enzima encontrada nos produtos. O valor lido foi multiplicado por 10, que era o fator de diluição da amostra, já que utilizava-se na análise 0,5 g da amostra diluída em 5,0 mL de solução tampão.

Valores superiores a 350,0 mU/Kg são considerados indicativos de pasteurização imprópria ou contaminação do produto final com matéria-prima crua (FDA, 2003 e Rocco, 2004).

2.3.2. Método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico

Utilizou-se as metodologias descritas por Rocco (2004), no Standard Methods for the Examination of Dairy Products.

Partindo-se das amostras congeladas a -15 °C (\pm 1°C) pesou-se porções de 0,5 g diretamente nos tubos de ensaio, em triplicata. Pesou-se também 0,5 g do controle negativo, que se tratava de manteiga aquecida a 95 °C, por 1 minuto. Os tubos foram colocados em banho-maria, a 40 °C (\pm 1°C), por alguns minutos, até derretimento da manteiga. Adicionou-se a cada tubo 5,0 mL de solução substrato de trabalho (fenilfosfato dissódico 0,1% m/v) – concentração simples. Eles foram agitados e incubados em banho-maria a 40 °C (\pm 1°C), por, exatamente, 15 minutos, contados a partir do momento em que a temperatura no interior de um tubo controle contendo substrato atingisse 40 °C. Após a incubação, os tubos foram removidos e adicionados de 0,1 mL de solução CQC 0,3% m/v e 0,1 mL de catalisador sulfato de cobre (CuSO₄) 0,2% m/v. Os tubos foram re-incubados por mais 5 minutos a 40 °C (\pm 1°C) e colocados em banho de gelo, com temperatura máxima de 10 °C, por, aproximadamente, 15 minutos. Retirou-se, com o auxílio de uma espátula, a fina camada sólida de gordura formada, e a fase aquosa de cada

tubo foi transferida para tubos limpos e previamente identificados. Adicionou-se 3,0 mL de butanol neutralizado e resfriado a -20 °C. Inverteu-se 4 vezes em meio ciclo, ou seja, inverteu-se o tubo em 1 segundo e pausou-se mais 1 segundo (meio ciclo). Esse procedimento foi realizado por 4 vezes. Os tubos foram deixados em repouso por 2 minutos e, então, repetiu-se os passos de inversão (4 tempos em meio ciclo). Obteve-se, desta forma, a fase alcoólica contendo o indofenol produzido pela reação do CQC com o fenol originado da hidrólise do substrato pela ação da enzima ALP.

Os tubos permaneceram em repouso por 2 horas para que fosse possível a obtenção de uma camada alcoólica límpida (camada superior) e realizou-se a análise visual e espectrofotométrica. Ambas as análises foram realizadas com base na comparação dos tubos das amostras com uma curva de calibração, obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de fenol equivalente por mL de solução.

2.3.3. Modificação do método rápido de Scharer: “Método da Fase Aquosa”

Partindo-se das amostras de manteiga congeladas a -15 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), pesou-se porções de 30,0 gramas, em tubos centrífugas com capacidade de 50,0 mL. Os tubos foram colocados em banho-maria, a 45 °C, por 20 minutos, para derretimento da manteiga e centrifugados a 1200 x g por 10 minutos para separação das fases aquosa e oleosa. A fase oleosa foi descartada e a fase aquosa foi reservada para a realização das análises.

Porções de 0,5 mL da fase aquosa da amostra, do controle de interferentes (uso de tampão carbonato – solução de trabalho, em substituição da solução de substrato) e do controle negativo (fase aquosa tratada a 95 °C, por 1 minuto) foram colocadas diretamente nos tubos de ensaio (em triplicata).

Adicionou-se a cada tubo 5,0 mL de solução substrato de trabalho (fenilfosfato dissódico 0,1% m/v) – concentração simples. Eles foram agitados e incubados em banho-maria a 40 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), por, exatamente, 15 minutos, contados a partir do momento em que a temperatura no interior de um tubo controle contendo substrato fosse de 40 °C. Após a incubação, retirou-se os tubos e adicionou-se de 0,1 mL de solução CQC 0,3% m/v e 0,1 mL de catalisador

sulfato de cobre (CuSO_4) 0,2% m/v, colocando-os por mais 5 minutos a 40 °C (\pm 1°C). Ao final da incubação, seguiu-se a transferência dos tubos para o banho de gelo, com temperatura máxima de 10 °C, por, aproximadamente, 15 minutos. Adicionou-se 3,0 mL de butanol neutralizado e resfriado a -20 °C. Inverteu-se 4 vezes em meio ciclo, ou seja, inverteu-se o tubo em 1 segundo e pausou-se mais 1 segundo (meio ciclo). Esse procedimento foi realizado por 4 vezes. Os tubos foram deixados em repouso por 2 minutos e então repetiu-se os passos de inversão (4 tempos em meio ciclo). Obteve-se, desta forma, a fase alcoólica contendo o indofenol produzido pela reação do CQC com o fenol originado da hidrólise do substrato pela ação da enzima ALP.

Os tubos permaneceram em repouso por 2 horas, para que se fosse possível a obtenção de uma camada alcoólica límpida (camada superior), e realizou-se a análise visual e espectrofotométrica. Ambas as análises foram realizadas com base na comparação dos tubos das amostras com uma curva de calibração, obtida a partir de soluções de fenol em água nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 μg de fenol equivalente por mL de solução.

Os tubos referentes às amostras foram comparados com o tubo do controle negativo e com o controle de interferentes, cujas colorações apresentavam-se sempre amarela. Logo, quando se obtinha uma coloração amarela para as amostras analisadas, o resultado foi interpretado como “negativo”, e quando se obtinha uma coloração esverdeada, verde ou azul, o resultado foi interpretado como “positivo”.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ensaios preliminares constatou-se que ao separar a manteiga em suas fases aquosa e oleosa, cerca de 90,0% da ALP concentrava-se na fase aquosa (Quadro 1).

Quadro 1 – Análise da atividade residual da ALP pelo método fluorimétrico em manteiga (adicionada de 0,1% v/v de creme cru) e em suas fases aquosa e oleosa.

Amostra	Atividade (mU/Kg)	Quantidade de amostra	Atividade final da fosfatase
Manteiga	3.259,00	30,0 g	97,77 mU/30,0 g
Fase oleosa	303,00	25,5 mL	7,73 mU/25,5 mL
Fase aquosa	11.373,00	7,5 mL	85,30 mU/7,5 mL

A partir dos resultados dos testes preliminares, propôs-se a utilização da fase aquosa da manteiga, em substituição ao uso do produto integral para análise da atividade residual da ALP.

As manteigas com atividade próxima a 350,0 mU/Kg, utilizadas nas seis repetições durante o desenvolvimento do método da fase aquosa, apresentaram atividade entre 315,0 e 430,0 mU/Kg (como pode ser visto no Quadro 2). Estes valores corresponderam à adição entre 0,015% e 0,025% (v/v) de creme cru adicionado ao creme pasteurizado, dependendo da atividade inicial da enzima no creme cru.

Quadro 2 – Resultados obtidos para as amostras com atividade próximas a 350,0 mU/Kg, nas 6 repetições realizadas para o desenvolvimento do “método da fase aquosa”.

Repetição	Porcentagem de creme cru (v/v)	Método Fluorimétrico mU/Kg
R1	0,015%	354,0
R2	0,015%	354,0
R3	0,015%	329,0
R4	0,025%	391,0
R5	0,015%	315,0
R6	0,025%	430,0
	Desvio Padrão (DP)	42,2

No método modificado, em que foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL de fase aquosa, em substituição à alíquota de 0,5 g de manteiga utilizado no método rápido de Scharer convencional, foi possível distinguir, visualmente, as manteigas com atividade próxima a 350,0 mU/Kg das manteigas pasteurizadas, em todas as 6 repetições realizadas (Quadro 3).

Quadro 3 – Resultados das análises das manteigas e respectivas fases aquosas, nas 6 repetições realizadas, utilizando o método rápido de Scharer visual convencional e o método modificado desenvolvido.

Amostra de Manteiga	Scharer Visual (Convencional)		Scharer Visual (Modificado)	
	Coloração	Nº resultados positivos	Coloração	Nº resultados positivos
Pasteurizada	Transparente	0	Amarela	0
Próxima a 350,0 mU/Kg	Transparente	0	Esverdeada	6
Alta atividade*	Azul claro	6	Verde	6

* manteiga fabricada a partir da adição de 0,050% (v/v) de creme cru ao creme pasteurizado.

Os tubos correspondentes a manteigas com atividade próxima a 350,0 mU/Kg apresentaram, sempre, coloração esverdeada, considerada como resultado positivo. Esta cor é resultante da mistura da coloração amarela (presente também no controle negativo e de interferentes) com a coloração azul do indofenol produzido após a hidrólise do substrato pela ação da ALP e subsequente reação com CQC. Quando a quantidade de indofenol (azul) fica mais alta, em relação à coloração amarela dos controles, a coloração final esverdeada também fica mais intensa.

Apesar das colorações obtidas para as amostras e controles no método modificado serem diferentes do método convencional, foi possível utilizar a mesma curva de calibração para a análise espectrofotométrica, pois o comprimento de onda de 650 nm utilizado correspondeu à maior absorção da coloração azul. Além disso, utilizou-se para os cálculos da concentração de fenol nas amostras, a

absorbância líquida, que correspondia à absorbância da amostra subtraída da absorbância do controle negativo, obtendo-se, assim, apenas a absorbância que realmente correspondia à quantidade de indofenol produzido pela ação da enzima.

Pela análise espectrofotométrica da fase aquosa foi possível observar aumento de, aproximadamente, 3,3 vezes na sensibilidade do método. As manteigas com atividade próxima a 350,0 mU/Kg apresentaram média de 0,23 µg de fenol/g de manteiga ou 0,115 µg de fenol por amostra (0,5 g de manteiga) pelo método convencional. Ao utilizar o método modificado, foi possível obter valor médio de 0,77 µg de fenol/mL de fase aquosa ou 0,385 µg de fenol por amostra (0,5 mL de fase aquosa) (Quadro 4).

O alto desvio padrão encontrado na análise das manteigas com alta atividade, fabricadas a partir da adição de 0,050% (v/v) de creme cru ao creme pasteurizado, pode ser explicado pela variação da atividade da ALP no creme cru utilizado nas diferentes repetições. Valores altos também foram encontrados por Castro (2005) na análise de leite fluido.

Quadro 4 – Resultados das análises das manteigas e respectivas fases aquosas nas 6 repetições realizadas, pelo o método rápido de Scharer espectrofotométrico convencional e o método modificado desenvolvido.

Amostra de manteiga	Scharer Espectrofotométrico			
	Convencional*	Convencional*	Modificado*	Modificado*
	µg/g de manteiga	µg/amostra	µg/mL de fase aquosa	µg/amostra
Pasteurizada	0,01 ± 0,06	0,005 ± 0,03	0,05 ± 0,07	0,025 ± 0,035
Próxima a 350,0 mU/Kg	0,23 ± 0,06	0,115 ± 0,03	0,77 ± 0,12	0,385 ± 0,06
Alta atividade**	0,83 ± 0,30	0,415 ± 0,15	3,12 ± 0,94	1,56 ± 0,47

* média das 6 repetições realizadas.

** manteiga fabricada a partir da adição de 0,050% (v/v) de creme cru ao creme pasteurizado.

Estudos anteriores relataram que produtos com alto teor de gordura possuíam uma maior atividade da ALP, pelo fato de grande parte da enzima estar

adsorvida à membrana dos glóbulos de gordura (Painter, 1995; Angelino et al., 1999 e Claves et al., 2002). Angelino et al. (1999) trabalharam com leites contendo 0,5%; 2,0% e 3,25% de gordura e concluíram que a atividade residual da ALP era diretamente proporcional ao teor de gordura. Mas, independente disso, o tratamento térmico de 63 °C por 30 minutos, estabelecido pela FDA para a pasteurização lenta do leite, reduziu a atividade da ALP para valores abaixo de 350,0 mU/L.

Apesar de grande parte da enzima encontrar-se adsorvida à membrana dos glóbulos de gordura, ela não é lipossolúvel e, após a separação das fases da manteiga, pouquíssima atividade é encontrada na fração oleosa ou butteroil, como é reportado por Hetrick e Tracy (1948), justificando assim, o uso da fase aquosa, para análise da atividade residual da ALP, em substituição à amostra integral da manteiga.

Vários estudos já foram realizados com o intuito de desenvolver métodos mais sensíveis e mais rápidos para a determinação da atividade residual da ALP em leite e seus produtos (Rocco, 1990; Sharma et al., 2003; Castro, 2005; Chen et al., 2005 e Serra et al., 2005).

Apesar de o método fluorimétrico apresentar alta sensibilidade, rapidez e facilidade de realização, sua grande desvantagem está no alto custo das análises. Atualmente, o custo dos reagentes para a análise de cada amostra de manteiga pelo Fluorophos® é de R\$ 24,48, sem levar em consideração o custo do equipamento, dos utensílios (cubetas, pipetadores, calibradores, entre outros) e da mão-de-obra. Já para o método modificado, o custo com reagentes para a realização da análise de uma amostra é de R\$ 1,15, ou seja, um custo cerca de 20 vezes inferior em relação ao Fluorophos®.

4. CONCLUSÃO

Os métodos fluorimétrico e de quimiluminescência são os únicos que, atualmente, detectam os limites residuais de fosfatase alcalina estabelecidos pela FDA, para produtos lácteos. O método modificado, onde empregou-se a fase aquosa da manteiga em substituição ao uso da amostra integral, permitiu o aumento da sensibilidade, tanto do método rápido de

Scharer visual, como do espectrofotométrico, com limite de detecção igual ou próximo de 350,0 mU/Kg.

Logo, o “Método da Fase Aquosa” constitui uma alternativa, para a detecção de baixas concentrações residuais de ALP em manteiga, e apresenta como maior vantagem o seu baixo custo por análise.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANCED INSTRUMENTS. **The advanced[®] fluorometer – user’s manual.** Advanced Instruments Inc. Dairy and Food Technology Division, Needham Heights, Massachusetts, 1992.

ANGELINO, P.D., CHRISTEN, G.L., PENFIELD, M.P., BEATTIE, S. Residual alkaline phosphatase activity in pasteurized milk heated at various temperatures – measurement with the Fluorophos and Sharer rapid phosphatase tests. **Journal of Food Protection.** v. 62. nº 1. p. 81-85, 1999.

CASTRO, P.R.S. Modificação do método de Scharer para determinação da atividade de fosfatase alcalina em leite. **Dissertação de mestrado.** Universidade Federal de Viçosa. 51 p. 2005.

CLAEYS, W.L., LOEY, A.M., HENDRICKX, M.E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. **Trends in Food Science & Technology.** v. 13. p. 293-311, 2002.

CHEN, CHAO-CHENG, TAI, YU-CHANG, SHEN, SZU-CHUAN, TU, YANN-YING, WU, MING-CHANG, CHANG, HUNG-MIN. Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using immunoglobulin in yolk (IgY) specific against bovine milk alkaline phosphatase. **Food Chemistry.** p. 1-8, 2005.

ECKNER, K.F. Fluorometric analysis of alkaline phosphatase inactivation correlated to Salmonella and Listeria inactivation. **Journal of Food Protection**. v. 55. n°. 12. p-960-963, 1992.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - CFSAN/Office of Compliance. Grade "A" **Pasteurized Milk Ordinance**. Public health service publication (2003 Revision). Center for Food Safety & Applied Nutrition. Washington. DC. 340 p. 2003.

FOX, P.F., KELLY, A.L., Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects – part 2. **International Dairy Journal**. v. 16, p. 517 – 532, 2006.

HETRICK J.H., TRACY, P.H. Effect of high-temperature short-time heat treatments on some properties of milk. I. Inactivation of the phosphatase enzyme. **Journal of Dairy Science**. v. 31. p. 867-879, 1948.

KARMAS, R., KLEYN, D.H. Determination and interpretation of alkaline phosphatase activity in experimental and commercial butters. **Journal of Dairy Science**. v. 73. n° 3. p.584 – 589, 1990.

MURTHY, G.K., KLEYN, D.H., RICHARDSON, T., ROCCO, R.M. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 16th Edition. Edited by Robert T. Marshall. p. 412-430, NW Washington, DC. 1992.

PAINTER, C.J. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time/temperature treatments. **Thesis (Master of Science)**. University of Wisconsin-Madison. 119 p. 1995.

RYAN, C.A., NICKELS M.K., HARGRETT-BEAN, N.T., POTTER, M.E., ENDO, T., MAYER, L., LANGKOP, C.W., GIBSON, C., MCDONALD, R.C., KENNEY, R.T., PUHR, N.D., MCDONNELL, P.J., MARTIN, R.J., COHEN, M.L., BLAKE, P.A. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. **JAMA, Dec. 11**. v. 258. n° 22. p. 3269-3274, 1987.

ROCCO, R.M., FITTS, J. Chapter 14: Alkaline Phosphatase Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. American Public Health Association. 17th Edition. Edited by H. Michael Wehr and Joseph F. Frank. p. 341-362, NW Washington, DC. 2004.

ROCCO, R.M. Fluorimetric analysis of alkaline phosphatase in fluid dairy products. **Journal of Food Protection**. v. 53. n° 7. p. 588-591, 1990.

SHARMA, S. K., SEHGAL, N., KUMAR, A., Dry-reagent strips for testing milk pasteurization. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.** v 36. p. 567-571, 2003.

SERRA, B., MORALES, M.D., REVIEJO, A.J., HALL, E.H., PINGARRÓN, J.M. Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. **Analytical Biochemistry**. v. 336. p. 289-294, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

O estudo da variação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) é importante porque, mesmo que ocorram variações, o tratamento térmico a que o creme cru é submetido deve garantir que a atividade residual da enzima esteja dentro dos limites legais estabelecidos pela FDA, que atualmente é de 350,0 mU/kg, pelo método fluorimétrico.

Os resultados encontrados na avaliação da atividade residual da enzima em amostras comerciais reforçaram a importância e a necessidade de se estabelecer, no Brasil, a análise da atividade da ALP como procedimento obrigatório para averiguação da qualidade da manteiga.

Manteigas fabricadas a partir de creme pasteurizado adicionado de concentrações entre 0,010% e 0,025% (v/v) de creme cru corresponderam ao limite de 350,0 mU/kg estabelecido pela FDA.

O método rápido de Scharer visual foi capaz de detectar somente concentrações a partir de 0,050% de creme cru, e portanto, não apresentou sensibilidade condizente com o método fluorimétrico. O método espectrofotométrico foi mais sensível, e por meio dele foi possível detectar a concentração de creme cru correspondente ao limite estabelecido, mas que não correspondia à concentração de creme cru e à quantidade de fenol/g de amostra, preconizadas por vários autores, como indicativos de pasteurização ineficiente. Para que o método rápido de Scharer pudesse ser utilizado com segurança, modificações foram realizadas, tornando-o mais sensível e eliminando os problemas levantados em relação à sua realização.

Com a utilização da nova metodologia desenvolvida neste trabalho, foi possível distinguir visualmente as manteigas com atividade igual ou próxima a 350,0 mU/Kg das manteigas pasteurizadas e dos controles negativo e de interferentes. Na análise espectrofotométrica, obteve-se um aumento da sensibilidade do método convencional de, aproximadamente, 3,3 vezes.

Desta forma, o método modificado apresentou um limite de detecção de acordo com os limites estabelecidos pela FDA, sendo uma alternativa de custo mais acessível para a determinação de baixas concentrações residuais desta enzima em manteiga, em relação ao método fluorimétrico.

ANEXO A

Atividade da fosfatase alcalina no creme cru padronizado coletado no verão, outono e inverno, pelo método fluorimétrico (Fluorophos®).

Quadro 1A – Atividade da ALP (mU/L) nas amostras de creme cru padronizado coletadas no verão.

Amostra	Repetição	Atividade (mU/L)
1	1	16.188.500,00
1	2	15.080.000,00
1	3	14.830.000,00
1	4	15.027.500,00
2	1	16.503.000,00
2	2	17.455.000,00
3	1	21.417.000,00
3	2	19.004.000,00
4	1	14.301.000,00
4	2	13.956.000,00
5	1	18.296.000,00
5	2	17.919.000,00
6	1	20.907.000,00
6	2	20.815.000,00
Média		17.264.214,29
Desvio padrão (DP)		2.554.645,65
Coeficiente de variação (%)		14,80

Quadro 2A – Atividade da ALP (mU/L) nas amostras de creme cru padronizado coletadas no outono.

Amostra	Repetição	Atividade (mU/L)
1	1	27.596.000,00
1	2	29.871.000,00
2	1	19.050.000,00
2	2	16.581.000,00
3	1	15.221.000,00
3	2	16.338.000,00
4	1	19.505.000,00
4	2	18.149.000,00
5	1	15.901.000,00
5	2	16.172.000,00
6	1	17.184.000,00
6	2	16.761.000,00
7	1	10.081.000,00
7	2	9.663.000,00
Média		17.719.500,00
Desvio padrão (DP)		5.476.910,96
Coefficiente de variação (%)		30,91

Quadro 3A – Atividade da ALP (mU/L) nas amostras de creme cru padronizado coletadas no inverno.

Amostra	Repetição	Atividade (mU/L)
1	1	13.308.000,00
1	2	11.336.000,00
2	1	14.513.000,00
2	2	13.414.000,00
3	1	16.384.000,00
3	2	15.855.000,00
4	1	12.223.000,00
4	2	13.956.000,00
5	1	14.949.000,00
5	2	14.802.000,00
6	1	15.028.000,00
6	2	15.207.000,00
7	1	14.425.000,00
7	2	13.354.000,00
Média		14.196.714,29
Desvio padrão (DP)		1.375.055,21
Coefficiente de variação (%)		9,69

ANEXO B

Análise de variância e cálculo dos desvios padrões das amostras de creme cru padronizadas, obtidas nas três diferentes estações do ano, realizada com o auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS).

Quadro 1B – Resposta obtida na utilização do programa para leitura dos dados relativos à atividade da ALP no creme cru padronizado e realização da análise de variância (ANOVA), ao nível de 5,0% de probabilidade, teste de médias (Duncan) e cálculo dos desvios padrões.

The SAS System					8
10:28 Monday, October 16, 2006					
Obs	EST	AMO	REP	ALP	
1	1	1	1	16188500	
2	1	1	2	15080000	
3	1	1	3	14830000	
4	1	1	4	15027500	
5	1	2	1	16503000	
6	1	2	2	17455000	
7	1	3	1	21417000	
8	1	3	2	19004000	
9	1	4	1	14301000	
10	1	4	2	13956000	
11	1	5	1	18296000	
12	1	5	2	17919000	
13	1	6	1	20907000	
14	1	6	2	20815000	
15	2	1	1	27596000	
16	2	1	2	29871000	
17	2	2	1	19050000	
18	2	2	2	16581000	
19	2	3	1	15221000	
20	2	3	2	16338000	
21	2	4	1	19505000	
22	2	4	2	18149000	
23	2	5	1	15901000	
24	2	5	2	16172000	
25	2	6	1	17184000	
26	2	6	2	16761000	
27	2	7	1	10081000	
28	2	7	2	9663000	
29	3	1	1	13308000	
30	3	1	2	11336000	
31	3	2	1	14513000	
32	3	2	2	13414000	

33	3	3	1	16384000
34	3	3	2	15855000
35	3	4	1	12223000
36	3	4	2	13956000
37	3	5	1	14949000
38	3	5	2	14802000
39	3	6	1	15028000
40	3	6	2	15207000
41	3	7	1	14425000
42	3	7	2	13354000

The SAS System 9
10:28 Monday, October 16, 2006

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
EST	3	1 2 3

Number of Observations Read	42
Number of Observations Used	42

The SAS System 10
10:28 Monday, October 16, 2006

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: ALP

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	1.0279202E14	5.1396008E13	4.01	0.0260
Error	39	4.9937608E14	1.2804515E13		
Corrected Total	41	6.021681E14			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALP Mean
0.170703	21.82783	3578340	16393476

The SAS System 15
10:28 Monday, October 16, 2006

The ANOVA Procedure

Duncan's Multiple Range Test for ALP

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 39
 Error Mean Square 1.28E13

Number of Means 2 3
 Critical Range 2735691 2876314

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	EST
A	17719500	14	2
A	17264214	14	1
B	14196714	14	3

CÁLCULO DOS DESVIOS PADRÕES

The SAS System 40
 10:28 Monday, October 16, 2006

----- EST=1 -----

The MEANS Procedure

Analysis Variable : ALP

N	Mean	Std Dev
14	17.264.214,29	2.554.645,65

----- EST=2 -----

Analysis Variable : ALP

N	Mean	Std Dev
14	17.719.500,00	5.476.910,96

----- EST=3 -----

Analysis Variable : ALP

N	Mean	Std Dev
14	14.196.714,29	1.375.055,21

ANEXO C

Preparo das soluções utilizadas na determinação da ALP pelo método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico segundo Rocco (2004)

1. Branco ou Controle Negativo: pesar 5,0 g da amostra em um tubo e colocá-lo em banho de água fervente, a 95 °C, por 1 minuto, a partir do momento em que a temperatura do interior do tubo atingir 95 °C. Retirar o tubo, resfriá-lo em banho de gelo e armazenar o tubo em congelador, com as demais amostras.

2. Controle Negativo para diluição (Teste de Reativação): transferir 15,0g da amostra para um tubo colocá-lo em banho de água fervente a 95 °C por 1 minuto, a partir do momento em que a temperatura do interior do tubo atingir 95 °C.

3. Substrato de trabalho em tampão carbonato – concentração simples*:
 - Dissolver 0,5g de fenilfosfato de sódio em 10,0 mL de água destilada e transferir para um funil de separação de 100mL;
 - Adicionar 25,0mL de tampão carbonato – solução estoque pH=9,8, 0,1mL de CQC e 0,1mL de sulfato de cobre;
 - Agitar e deixar em repouso por 5 minutos;
 - Adicionar 10,0mL de butanol neutralizado resfriado;
 - Inverter o funil de separação por 20 vezes, em intervalos de 1 segundo;
 - Deixar em repouso por 15 minutos para separação das fases;
 - Coletar a fase aquosa, transferir para um outro funil e repetir os três últimos procedimentos por mais duas vezes;
 - Ao final da terceira extração, coletar a fase aquosa em um balão volumétrico de 500,0 mL, completar o volume com água destilada e transferir a solução para um frasco âmbar devidamente identificado;
 - A solução obtida tem concentração de 0,1% m/v de fenilfosfato.

4. Solução de CQC: Dissolver 30,0 mg do CQC (2,6-dicloroquinona 4-cloroimida) em 10,0 mL de metanol. Estocar em um frasco âmbar sob refrigeração, a solução é estável por 3 meses. Não utilizar se a solução estiver turva ou amarronzada. A concentração da solução obtida é de 0,3% (m/v).

5. Catalisador: dissolver 200,0 mg de sulfato de cobre anidro (CuSO_4) com água destilada, transferir para balão volumétrico de 100,0 mL e completar o volume. Estocar em frasco de vidro sob refrigeração. A solução obtida tem concentração de 0,2% (m/v).

6. Butanol neutralizado para extração do indofenol: ponto de ebulição entre 116-118 °C. Neutralizar os ácidos livres: adicionar 10,0 mL do tampão carbonato – solução estoque (item 7) em 3,785 L de álcool n-butílico. Misturar completamente e estocar sob refrigeração a -20 °C.

7. Tampão Carbonato-solução estoque: pH=9,8. Dissolver 46,89 g de carbonato de sódio e 37,17 g de bicarbonato de sódio em um recipiente com capacidade para 1 litro. Dissolver com água destilada. Essa solução é estável por 6 meses sob refrigeração;

8. Tampão Carbonato de Trabalho – concentração simples (controle de interferentes): pH=9,8. Transferir 5,0 mL da solução estoque (item 7) para balão volumétrico de 100,0 mL e completar o volume com água destilada. A solução é estável por 6 meses sob refrigeração.

9. Solução de acetato de magnésio 0,354 g/mL (Teste de Reativação): dissolver 35,4g de $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ em 50,0mL de água destilada. Aquecer para dissolução completa, transferir para balão volumétrico de 100,0 mL e completar o volume com água destilada. A solução é estável por 6 meses quando estocada a 4 °C.

* foram feitas algumas modificações nos procedimentos de preparo desta solução, no intuito de se garantir que a solução de substrato obtida estivesse totalmente isenta de fenol livre.

ANEXO D

Preparo da curva de calibração utilizada no método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico segundo Rocco (2004) e também no novo método desenvolvido

1. Preparar, de acordo com os procedimentos descritos no final deste ANEXO, as seguintes soluções de fenol: solução estoque (1,0 mg/mL), solução intermediária A (10,0 µg/mL) e solução intermediária B (1,0 µg/mL);
2. Partindo da solução intermediária B (1,0 µg/mL), preparar a série de tubos descritos no Quadro 1B:

Quadro 1D - Construção da curva de calibração.

Tubo	Solução B de fenol (1,0 µg/mL)	Água (mL)	Quant. de fenol em µg/0,5 mL	1,0 mL ou g de amostra µg/mL de fenol equivalente*
1	0,0 mL	5,0	0,0	0,0
2	0,5	4,5	0,5	1,0
3	1,0	4,0	1,0	2,0
4	2,5	2,5	2,5	5,0
5	5,0	0,0	5,0	10,0

* na análise das amostras se alíquotas de 0,5 mL ou g. Todavia, os resultados são reportados em µg de fenol produzido/mL ou g de amostra. Mas como os valores de concentração de fenol da curva já são convertidos em concentrações de fenol equivalente, nenhuma conversão adicional em relação à quantidade de amostra utilizada se faz necessária.

3. Adicionar a cada tubo 0,5 mL de Tampão Carbonato - solução estoque, 0,1mL de reagente CQC e 0,1mL de catalisador sulfato de cobre;
4. Agitar os tubos e incubar imediatamente em banho-maria a 40 °C +/- 1 °C por 5 minutos, depois que a temperatura desejada seja atingida (monitorar a

temperatura colocando um termômetro dentro de um tubo contendo 5,0 mL de água);

5. Após os 5 minutos, retirar os tubos do banho-maria e colocá-los em banho de gelo a 10 °C por no mínimo 15 minutos;

6. Adicionar a cada tubo 3,0 mL de butanol neutralizado para extração do indofenol formado;

7. ** Inverter cada tubo por seis voltas completas, em intervalos de 1 segundo a cada meio ciclo completado (inverter em 1 segundo, esperar 1 segundo, inverter em 1 segundo e esperar mais 1 segundo: repetir este procedimento por 6 vezes), ocorrendo assim a migração do indofenol formado para a camada alcoólica do butanol;

8. A curva obtida será utilizada para comparação com as amostras analisadas pelo método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico.

- **Soluções Utilizadas**

Ácido Clorídrico 0,1 N: Adicionar 8,3 mL de ácido clorídrico concentrado em um balão volumétrico de 500,0 mL, com água destilada pela metade. Misturar e completar o volume com água destilada.

Solução estoque de Fenol: pesar 1,0 g de fenol (reagente grau anidro), transferir para balão volumétrico de 1,0 L e diluir o volume com HCl 0,1 N. (1mL = 1 mg de fenol). Estocar a solução em frasco âmbar e guardar sob refrigeração (4 °C). A solução é estável por três meses.

Solução Intermediária A – 10,0 µg/mL (PREPARAR NO DIA!): diluir 5,0 mL da solução estoque com água, em um balão volumétrico de 500 mL. (1 mL = 10,0 µg de fenol).

Solução Intermediária B – 1,0 µg/mL (PREPARAR NO DIA!): diluir 10,0 mL da solução anterior (intermediária A) com água, em um balão volumétrico de 100 mL. (1mL = 1,0µg de fenol).

** foram feitas modificações nos procedimentos de inversão dos tubos para extração do indofenol, no intuito de garantir que todo indofenol produzido fosse extraído para fase alcoólica.

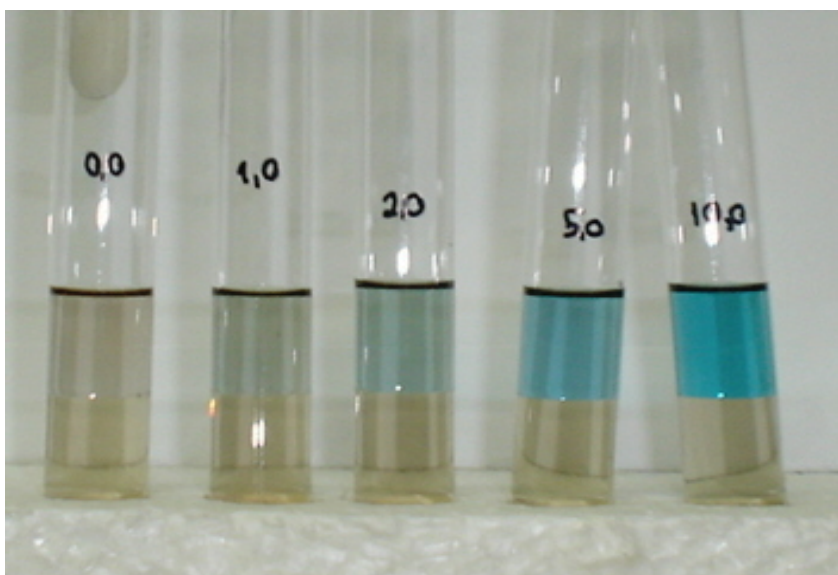


Figura 1D - Curva de Calibração contendo 0,0; 1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µg de fenol equivalente/mL.

ANEXO E

Curvas de calibração utilizadas na análise das manteigas comerciais, na avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer e no desenvolvimento do novo método (“método da fase aquosa”).

Quadro 1E – Curvas de calibração utilizadas para a avaliação das manteigas comerciais na primeira análise e na segunda análise (após o teste de reativação).

Repetição	Descrição	Curva de calibração	Coefficiente de determinação (r ²)
1	1ª análise	$\hat{y} = 0,0633X - 0,0057$	0,9997
1	2ª análise	$\hat{y} = 0,0634X - 0,0034$	0,9998
2	1ª análise	$\hat{y} = 0,0634X - 0,0034$	0,9998
2	2ª análise	$\hat{y} = 0,0606X + 0,0061$	0,9979
3	1ª análise	$\hat{y} = 0,0607X + 0,0042$	0,9981
3	2ª análise	$\hat{y} = 0,0601X + 0,0063$	0,9997
4	1ª análise	$\hat{y} = 0,0622X + 0,0045$	0,9997
4	2ª análise	$\hat{y} = 0,0625X + 0,0058$	0,9989

Quadro 2E – Curvas de calibração utilizadas nas repetições realizadas para avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico.

Repetição	Curva de calibração	Coefficiente de determinação (r ²)
1	$\hat{y} = 0,0653X + 0,0015$	0,9993
2	$\hat{y} = 0,0634X - 0,0034$	0,9998
3	$\hat{y} = 0,0606X + 0,0061$	0,9979
4	$\hat{y} = 0,0601X + 0,0063$	0,9997
5	$\hat{y} = 0,0657X - 0,0050$	0,9995
6	$\hat{y} = 0,0642X + 0,0081$	0,9995
7	$\hat{y} = 0,0625X + 0,0058$	0,9989
8	$\hat{y} = 0,0641X + 0,0091$	0,9990
9	$\hat{y} = 0,0697X + 0,0035$	0,9999
10	$\hat{y} = 0,0664X + 0,0103$	0,9994

Quadro 3E – Curvas de calibração utilizadas na etapa de desenvolvimento do novo método (“método da fase aquosa”).

Repetição	Curva de calibração	Coefficiente de determinação (r²)
1	$\hat{y} = 0,0685X - 0,0009$	0,9999
2	$\hat{y} = 0,0685X - 0,0009$	0,9999
3	$\hat{y} = 0,0706X + 0,0042$	0,9996
4	$\hat{y} = 0,0706X + 0,0042$	0,9996
5	$\hat{y} = 0,0693X + 0,0056$	0,9997
6	$\hat{y} = 0,0709X + 0,0079$	0,9995

ANEXO F

Resultados obtidos nas 10 repetições realizadas para avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico na determinação da atividade da ALP.

Quadro 1F – Resultados das análises das manteigas fabricadas com diferentes quantidades de creme cru (v/v) adicionadas utilizando o método rápido de Scharer visual, comparando as amostras tanto com o Controle Negativo (CN) como com o tubo 1,0 µg de fenol equivalente/mL da curva de calibração.

Creme cru (v/v)	Resultado Visual (Comparado com o Controle Negativo e com o 1,0 µg de fenol/g de amostra da curva padrão)																			
	R1		R2		R3		R4		R5		R6		R7		R8		R9		R10	
	CN*	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g	CN	1,0µg/g
0,000%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,010%	não**	não	-	-	-	-	não	não	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,015%	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,025%	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
0,050%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,100%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* CN = Controle Negativo.

** não foi realizada análise para esta concentração.

Quadro 2F – Resultados expressos em microgramas de fenol/g de amostra para as manteigas fabricadas com diferentes quantidades de creme cru (v/v) adicionadas e analisadas pelo método rápido de Scharer espectrofotométrico.

Creme cru (v/v)	Microgramas de fenol/ g de amostra *										
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Média
0,000%	0,01	-0,05	-0,23	-0,10	0,14	-0,08	-0,06	-0,06	-0,03	-0,14	-0,06
0,010%	não**	0,02	-0,13	não**	0,29	0,12	0,08	0,12	0,14	0,04	0,08
0,015%	0,38	0,18	0,00	-0,07	0,44	0,34	0,12	0,14	0,25	0,13	0,19
0,025%	0,70	0,32	0,05	0,00	0,52	0,59	0,21	0,42	0,28	0,24	0,33
0,050%	1,74	0,53	0,49	0,68	1,07	1,01	0,63	0,89	0,65	0,60	0,83
0,100%	3,30	1,54	1,17	1,51	1,58	2,18	1,36	1,76	1,48	1,29	1,72

* para cada repetição realizada utilizou-se uma curva de calibração, realizada juntamente com a análise das amostras.

** não foi realizada análise para esta concentração.

ANEXO G

Resultados obtidos para a análise espectrofotométrica na etapa de desenvolvimento do novo método (“método da fase aquosa”).

Quadro 1G – Resultados expressos em microgramas de fenol/g de amostra de manteiga para as 6 repetições realizadas pelo método rápido de Scharer espectrofotométrico convencional.

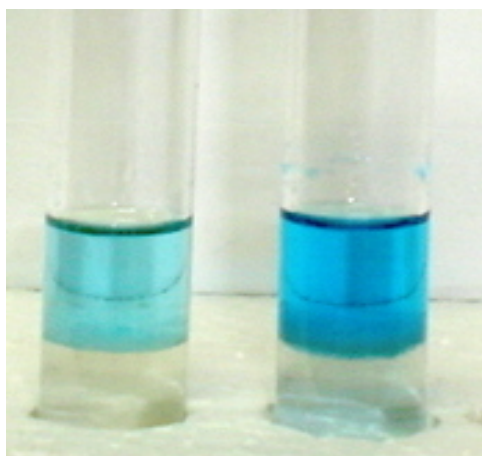
Manteiga	Micrograma de fenol/g de manteiga						Média
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
Pasteurizada	0,10	0,01	-0,05	-0,07	0,04	0,00	0,01
Próxima a 350,0 mU/Kg	0,32	0,22	0,15	0,22	0,17	0,27	0,23
Alta atividade	1,28	1,10	0,68	0,58	0,81	0,51	0,83

Quadro 2G – Resultados expressos em microgramas de fenol/mL de fase aquosa para as 6 repetições realizadas pelo novo método desenvolvido (“método da fase aquosa”).

Fase aquosa	Microgramas de fenol/mL de fase aquosa						Média
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
Pasteurizada	0,09	0,03	0,00	0,02	-0,03	0,16	0,05
Próxima a 350,0 mU/Kg	0,74	0,76	0,68	0,71	0,73	1,01	0,77
Alta atividade	4,25	4,13	2,45	1,85	3,18	2,84	3,12

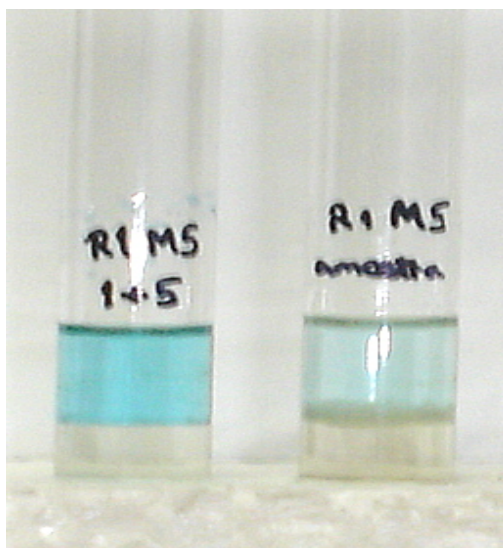
ANEXO H

Fotos dos resultados obtidos para algumas amostras comerciais da marca E analisadas pelo método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico.



Teste de Reativação diluído (1 + 5) Amostra

Figura 1H – Confirmação do resultado positivo para ALP residual em uma das amostras da marca E.



Teste de Reativação diluído (1 + 5) Amostra

Figura 2H – Ocorrência de reativação da ALP em uma das amostras da marca E.

ANEXO I

Fotos dos resultados obtidos em algumas das 10 repetições realizadas para avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer visual e espectrofotométrico.

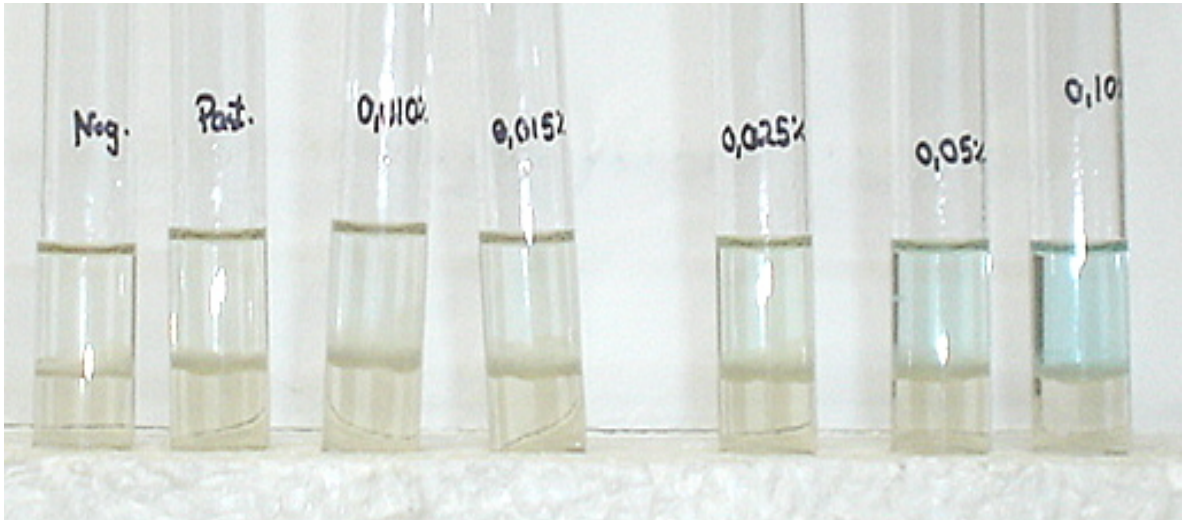


Figura 11 – Tubos do controle negativo, manteiga pasteurizada e manteigas fabricadas com 0,010%; 0,015%, 0,025%; 0,050% e 0,100% (v/v) de creme cru adicionado ao creme pasteurizado.

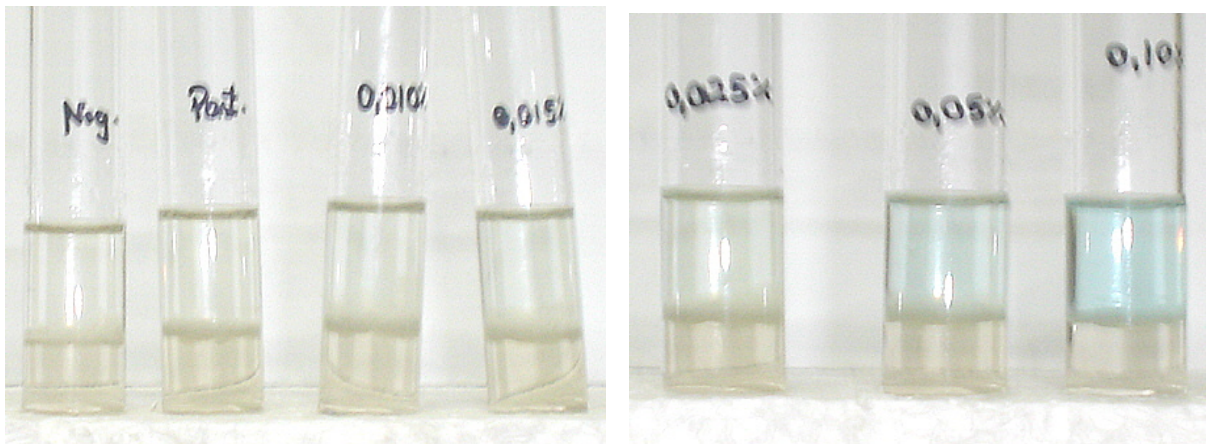


Figura 21 – Tubos obtidos em uma outra repetição da avaliação da sensibilidade do método rápido de Scharer.

ANEXO J

Fotos dos resultados obtidos em algumas das 6 repetições realizadas para o desenvolvimento do novo método (“método da fase aquosa”).

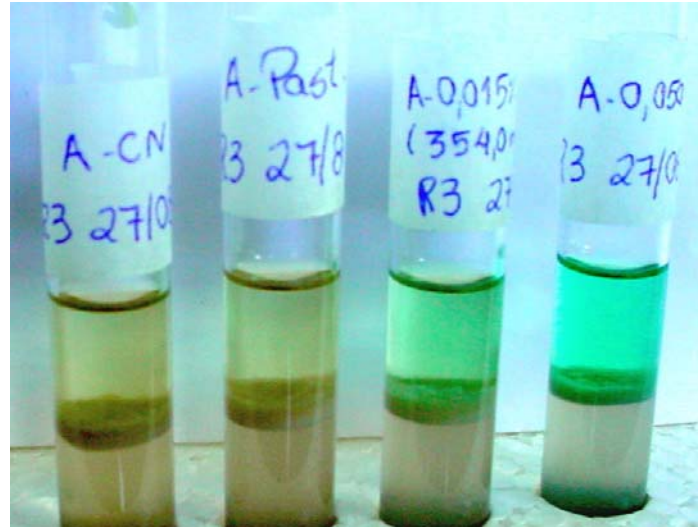


Figura 1J – Tubos correspondentes à análise das fases aquosas do controle negativo, da manteiga pasteurizada, da manteiga com atividade próxima a 350,0 mU/Kg e da manteiga com alta atividade, respectivamente.

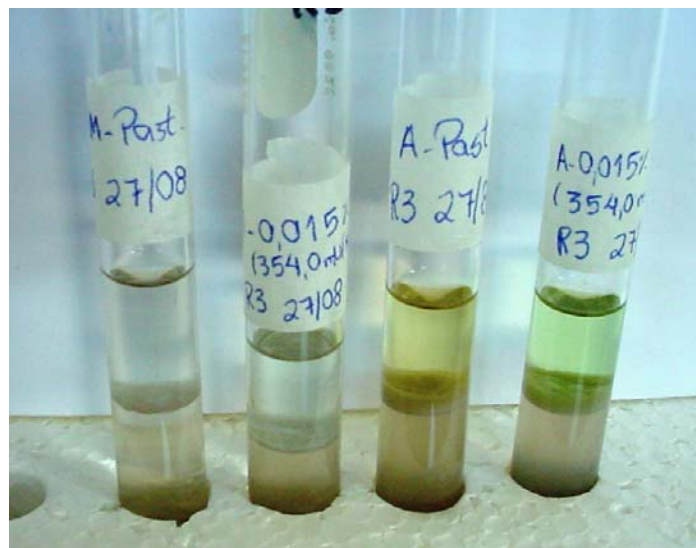


Figura 2J – Tubos referentes à análise da manteiga pasteurizada e da manteiga com atividade próxima a 350,0 mU/Kg, utilizando o método rápido de Scharer convencional e utilizando o novo método desenvolvido, respectivamente.